

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ
БИОЛОГИИ имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

На правах рукописи

Атабекова Анастасия Константиновна

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

1.5.3. Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Соловьев Андрей Геннадьевич

Москва – 2026

Оглавление

Оглавление	2
Список сокращений	4
Введение	6
Обзор литературы	11
1. Особенности транспорта вирусов растений	11
1.1. Плазмодесмы как путь симпластического транспорта	11
1.2. Транспортные белки	14
1.2.1 Транспортные белки, кодируемые тройным блоком генов	16
1.3. Репликация и транспорт вирусов растений сопряжены с ремоделированием клеточных мембран	17
2. Мембранные органеллы клетки	20
2.1. Плазматическая мембрана	20
2.2. Эндоплазматический ретикулум	20
2.3. Аппарат Гольджи	23
2.4. Сеть транс-Гольджи	25
2.5. Тонопласт	27
2.6. Ядерная оболочка	27
2.7. Пероксисомы	28
2.8. Митохондрии	29
2.9. Пластиды. Хлоропласты	30
3. Ремоделирование клеточных мембран (+)РНК-содержащими вирусами растений	31
3.1. Вирус-индуцированное ремоделирование мембран ЭПР	32
3.1.1. X вирус картофеля	32
3.1.2. Вирус табачной мозаики	37
3.1.3. Вирус мозаики костра	39
3.1.4. Вирус черного ожога свеклы	42
3.1.5. Вирус мозаики турнепса	43
3.2. Вирус-индуцированное ремоделирование мембран митохондрий	47
3.3. Вирус-индуцированное ремоделирование мембран вакуолей	48
3.4. Вирус-индуцированное ремоделирование мембран пероксисом	50
3.5. Вирус-индуцированное ремоделирование мембран хлоропластов	52
4. ВРК, как компартменты, связывающие процессы репликации и транспорта	54
5. Транспортные белки, кодируемые бинарным блоком транспортных генов	58

Материалы и методы.....	62
Результаты и обсуждение	81
1. Изучение взаимодействия белков BMB1 и BMB2 HGSV	81
1.1 Анализ взаимодействия белков BMB1 и BMB2 <i>in vitro</i>	81
1.2. Анализ взаимодействия белков BMB1 и BMB2 <i>in vivo</i>	81
1.3. Картирование участка BMB1, вовлеченного во взаимодействие с BMB2.....	84
1.4. Картирование региона BMB2, участвующего во взаимодействии с BMB1	87
1.5. Верификация данных мутационного анализа с помощью FRET-FLIM.....	92
1.6. Имитация комплекса BMB1-BMB2.....	92
2. Исследование структуры периферических мембранных телец, образование которых индуцируется белком BMB2	95
2.1. Анализ локализации BMB1 и BMB2 в составе PAMBs, а также в ассоциированных с ними ПД	95
2.2. Изучение ультраструктуры PAMBs в режиме AiryScan	98
2.3. Изучение ультраструктуры PAMBs с помощью ТЭМ	99
2.4. Изучение ультраструктуры PAMBs с помощью электронной томографии	101
2.5. Межмембранные контакты внутри PAMBs.....	102
2.6. Изучение способности BMB2 к олигомеризации	105
3. Изучение защитного ответа, вызываемого белком BMB1 в растениях <i>N. benthamiana</i>	108
3.1. Характеристика защитного ответа, который BMB1 вызывает в растениях <i>N. benthamiana</i>	108
3.2. BMB2 супрессирует защитный ответ, индуцированный BMB1	112
4. Изучение субклеточной локализации BMB1	114
4.1. Анализ ядерной локализации BMB1	114
4.2. Поиск сигналов ядерной локализации BMB1	116
4.3. Анализ BMB1 с искусственно добавленными NES или NLS.	117
Заключение.....	122
Список литературы	124

Список сокращений

АГ – аппарат Гольджи

АФК – активные формы кислорода

АТФ – аденозинтрифосфат

БО – белок оболочки

вРНК – вирусная РНК

вРНП – вирусный рибонуклеопротеидный комплекс

ВРК – вирусный репликативный комплекс

дни – дни после инфльтрации

МК – мембранные контакты

МТ – микротрубочки

ПМ – плазматическая мембрана

ПД – плазмодесма

ППС – предельная пропускная способность

ТБ – транспортный белок

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ВМВ – binary movement block, бинарный транспортный блок

СМ – convolitional membranes, свертывающиеся мембраны

ERES – endoplasmic reticulum export sites, сайты экспорта из ЭПР

ERIS – endoplasmic reticulum import sites, сайты импорта в ЭПР

ILV – intraluminal vesicles, интралюминальные везикулы

GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок

LNP – lunarpark protein, белок лунапарк

mRFP – monomeric red fluorescent protein, мономерный красный флуоресцентный белок

MVB – multivesicular bodies, мультивезикулярные тельца

ORF – open reading frame, открытая рамка считывания

PAMBs – plasmodesmata-associated membrane bodies, мембранные тельца, ассоциированные с плазмодесмами

RTNL – reticulon-like protein, ретикулон-подобный белок

TGB – triple gene block, тройной блок генов

TGN – trans-Golgi network, сеть транс-Гольджи

TMD – transmembrane domain, трансмембранный домен

Сокращения названий вирусов:

BBSV – beet black scorch virus, вирус черного ожога свеклы

BSMV – barley stripe mosaic virus, вирус полосатой мозаики ячменя

BMV – brome mosaic virus, вирус мозаики костра

CMV – cucumber mosaic virus, вирус мозаики огурца

HGSV – hibiscus green spot virus, вирус зеленой пятнистости гибискуса

MNSV – melon necrotic spot virus, вирус некротической пятнистости дыни

PVX – potato virus X, X вирус картофеля

RCNMV – red clover necrotic mosaic virus, вирус некротической мозаики красного клевера

TBSV – tomato bushy stunt virus, вирус кустистой карликовости томата

TMV – tobacco mosaic virus, вирус табачной мозаики

TuMV – turnip mosaic virus, вирус мозаики турнепса

Введение

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 вирусных геномов из первично зараженной клетки сначала в соседние клетки, а затем и по всему растению через сосудистую систему. Изучение механизмов, с помощью которых вирусы достигают координации процессов репликации и транспорта – является одним из наиболее интересных направлений фитовирусологии, а выявление общих закономерностей в этих процессах у разных групп вирусов, может способствовать созданию новых методов борьбы с этими патогенами.

Транспорт вирусов растений в сравнении с вирусами животных имеет ряд особенностей, связанных с тем, что наличие плотной клеточной стенки у растительных клеток вынуждает вирусы использовать для распространения специфические межклеточные каналы – плазмодесмы (ПД), соединяющие соседние клетки в тканях растений (Wu, Cheng, 2020). Размер вирионов и геномов вирусов больше, чем предельная пропускная способность (ППС) ПД, потому вирусам необходимо обладать способностью к активному транспорту своих геномов через ПД (Tilsner et al., 2016). Для этого вирусы растений кодируют специальные транспортные белки (ТБ), обеспечивающие 1) связывание вирусного генома; 2) транспорт вирусного генома к ПД; 3) модификацию ПД, приводящую к увеличению их ППС; 4) транспорт вирусного генома через ПД в соседние клетки (Morozov, Solovyev, 2024). Для осуществления первого этапа ТБ рекрутируются к местам репликации, где они могут связывать новосинтезированные дочерние вирусные геномы для дальнейших этапов транспорта. Для оптимизации процесса репликации вирусы формируют из эндомембран клетки специализированные мембранные компартменты - вирусные репликативные комплексы (ВРК), которые не только позволяют обеспечить благоприятную среду для эффективной репликации, но и способствуют процессу быстрого и селективного связывания дочерних геномов с ТБ, а у некоторых вирусов даже позволяют непосредственно сопрягать процесс репликации с процессом внутри- и межклеточного транспорта (Tilsner et al., 2013).

Для многих вирусов растений показано образование двух типов ВРК по мере развития инфекции. Первый тип представляет собой небольшие ВРК, которые могут быть

мобильны и направленно транспортироваться к ПД, а у некоторых вирусов - закореваться у ПД, образуя ассоциированные с ПД ВРК, при этом рекрутирование таких ВРК к ПД происходит вследствие взаимодействия с ТБ (Kumar, Dasgupta, 2021; Tilsner et al., 2013). Такие ВРК образуются на ранней стадии инфекции и координируют процессы репликации и транспорта, ускоряя процесс транспорта новосинтезированных геномов в соседние клетки. Второй тип ВРК представляет собой крупные тела, образующиеся, когда завершен этап, на котором, преимущественно, происходит межклеточный транспорт, обеспечиваемый ТБ, синтезируемыми в зараженной клетке на ранних стадиях инфекции, и начинается активное накопление вирусного капсидного белка и образование дочерних вирионов (Heinlein, 2015; Kumar, Dasgupta, 2021; Wu, Cheng, 2020).

Наиболее интригующими с точки зрения сопряжения процессов репликации и транспорта являются ВРК, ассоциированные с ПД, которые образуют некоторые вирусы. Предполагается, что в таких ВРК новосинтезированные дочерние вирусные геномы могут направляться непосредственно в каналы ПД (Tilsner et al., 2013). Такие ВРК изучены для Х-вируса картофеля (Potato virus X, PVX), содержащего тройной блок генов (Triple gene block, TGB) – консервативный блок генов, кодирующий три транспортных белка, обеспечивающих внутри- и межклеточный транспорт вируса. Белки TGB PVX наряду с репликацией 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 (Tilsner et al., 2013; Wu et al., 2019). Не так давно был открыт блок генов, родственник TGB, но кодирующий два ТБ и названный бинарным транспортным блоком (Binary movement block, BMB) (Lazareva et al., 2017). Белки данного транспортного блока также образуют PAMBs и являются необходимыми и достаточными для обеспечения межклеточного транспорта, по крайней мере в растениях *Nicotiana benthamiana* (Lazareva et al., 2017). Установление механизмов, посредством которых ТБ этого генного модуля обеспечивают транспорт вирусных геномов, изучение структуры образуемых для этого процесса PAMBs, 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 3D-модель этих мембранных структур. 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 ВМВ1 и ВМВ2, 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.

Обзор литературы

1. Особенности транспорта вирусов растений

Механизмы транспорта вирусов растений и животных имеют принципиальные отличия. Потомство вирусов животных высвобождаются из первично зараженной клетки путем почкования, экзоцитоза или лизиса клетки, попадая в межклеточное пространство, а затем и соседние клетки (Wu, Cheng, 2020). Клетки растений, в отличие от клеток животных, окружены плотной клеточной стенкой, поэтому вирусы растений вынуждены использовать для транспорта уже имеющиеся симпластические пути – каналы плазмодесм (ПД), которые пересекают клеточные стенки и обеспечивают прямой контакт между цитоплазмой соседних клеток (Wu, Cheng, 2020).

1.1. Плазмодесмы как путь симпластического транспорта

ПД обеспечивают особый тип межклеточной коммуникации, присущий исключительно для растений и характеризующийся непрерывностью цитоплазмы, плазматической мембраны (ПМ) и эндоплазматического ретикулула (ЭПР) соседних клеток (Pankratenko et al., 2020, Bayer, Benitez-Alfonso, 2026). Структурно ПД представляют собой цитоплазматические каналы в клеточных стенках, выстланные плазматической мембраной, в центре которых находится десмотрубочка – сильно суженная (до 8 нм в диаметре) трубочка ЭПР (Heinlein, 2015; Tee, Faulkner, 2024). При этом, ПМ и десмотрубочка располагаются очень близко друг к другу (на расстоянии 5-15 нм), что характерно для мембранных контактов (МК). МК представляют собой тип взаимодействия между двумя мембранами клетки, когда они находятся на расстоянии 5–30 нм, но не сливаются друг с другом (Levy, Tilsner, 2020). Предполагается, что классические МК позволяют осуществлять взаимодействие между органеллами, не прибегая к везикулярному транспорту и обеспечивают передачу сигналов, обмен липидами и, возможно, белками (Solovyev et al., 2022). В настоящее время ПД рассматриваются как особый, неканонический тип МК, регулирующий не внутриклеточный, а межклеточный транспорт макромолекул (Pérez-Sancho et al., 2025). ПД содержат на протяжении всей длины канала белковые структуры, напоминающие спицы колеса, тянущиеся от десмотрубочки к ПМ, образованные специализированными белками, характерными для МК, которые участвуют в регуляции транспорта через ПД (Pankratenko et al., 2020; Tee, Faulkner, 2024).

Небольшое пространство между ПМ и десмотрубочкой, пронизанное белковыми структурами, называется цитоплазматическим рукавом, и, как принято считать, служит основным путем обмена молекулами между соседними клетками. Считается, что ширина цитоплазматического рукава определяет предельную пропускную способность (ППС) ПД (Tee, Faulkner, 2024). ППС ПД может варьировать в зависимости от типа, возраста и физиологического состояния клеток. Небольшие растворимые молекулы (до 500 Да) свободно диффундируют по цитоплазматическому рукаву (Tilsner et al., 2016). Транспорт крупных молекул, таких как белки и РНК, как правило, требует задействования активных механизмов транспорта, подразумевающих увеличение ППС ПД. Однако диффузия крупных молекул также иногда может происходить, если их форма сопоставима с шириной цитоплазматического рукава. Например, свободный белок green fluorescent protein (GFP) с молекулярной массой около 27 кДа способен с низкой эффективностью диффундировать между некоторыми типами клеток, что, вероятно, связано с цилиндрической формой его молекул, которая позволяет ему проникать через узкое пространство цитоплазматического рукава (Sager, Lee, 2018). Помимо ППС ПД на динамику межклеточного транспорта влияет общее количество ПД, соединяющих соседние клетки, а также их распределение, так как кластеризация способствует увеличению эффективности транспорта (Tee, Faulkner, 2024).

В регуляции ППС ПД важную роль играет актин-миозиновый комплекс, а также белки, как локализующиеся внутри ПД, так и регулирующие ее работу извне. Классическим механизмом регуляции транспорта через ПД считается изменение толщины и состава клеточных стенок вокруг ПД, которое происходит вследствие изменения локального отложения β -1,3-глюкана, известного как каллоза (Storme De, Geelen, 2014). Каллоза, при накоплении в клеточной стенке, приводит к уменьшению ширины цитоплазматического рукава, прижимая ПМ к десмотрубочке (Pitzalis, Heinlein, 2017; Storme De, Geelen, 2014; Tilsner et al., 2016). Синтез этого полисахарида осуществляют каллозосинтазные комплексы, которые локализуются в ПМ, с активным центром, направленным в сторону клеточной стенки, а за деградацию каллозы отвечают β -1,3-глюканазы (Bayer, Benitez-Alfonso, 2026; Tee, Faulkner, 2024).

Ряд белков, локализованных в ПД и не связанных ни с одним из семейств каллозосинтаз или гидролаз, также может регулировать уровень отложения каллозы. Так, рецептороподобные интегральные мембранные белки семейства PDLP

(PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN), играют существенную роль в балансе отложения каллозы, например, PDLP5 непосредственно стимулирует работу каллозосинтазных комплексов, расположенных около ПД (Cui, Lee, 2016; Thomas et al., 2008). Белки семейства PLASMODESMATA CALLOSE BINDING FAMILY (PDBC) также играют важную роль в поддержании баланса каллозы. Показано, что X8-домен PDCB1 связывается с каллозой, стабилизируя ее, а увеличение экспрессии PDCB1 увеличивает отложение каллозы в ПД (Simpson et al., 2009). Изменение баланса каллозы происходит вследствие различных сигналов, связанных с биотическими и абиотическими стрессами, а также развитием и физиологическим состоянием растения (Tee, Faulkner, 2024). Однако точные молекулярные механизмы этого процесса остаются малоизученными. Также неясно, как клеточные стенки вокруг ПД остаются достаточно эластичными, чтобы обеспечивать транспорт крупных молекул. Считается, что в уменьшении жесткости и повышении эластичности клеточной стенки играют роль как присутствие самой каллозы, так и повышенное содержание определенных типов пектинов, которые создают гелеобразную матрицу, которая легче подвергается модификациям, нежели чем жесткие микрофибриллы целлюлозы (Li et al., 2021).

В последние годы стало понятно, что важнейшую роль в регуляции транспорта через ПД играют белки, участвующие в создании и поддержании МК. Среди них можно отметить белки VAP (VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE (VAMP)-ASSOCIATED PROTEIN), белки семейства MCTP (Multiple C2 domains and transmembrane region), и синаптотагмины (synaptotagmins, SYT), а также белки, поддерживающие определенный состав и структуру мембран – ретикулон-подобные белки (RETICULON-LIKE PROTEIN SUBFAMILY B, RTNLB), реморины, гермин-подобные белки (Pankratenko et al., 2020).

Основную роль в регуляции ППС ПД отводят белкам MCTP, а также белкам SYT. Белки MCTP обильно представлены в ПД, и для различных представителей семейства MCTP было показано, что они могут как положительно, так и отрицательно регулировать транспорт макромолекул и сигнальных молекул через ПД (Brault et al., 2019). Для белков SYT было показано участие в регуляции межклеточного транспорта многих вирусов (Uchiyama et al., 2014). Белки этих семейств связывают десмотрубочку и ПМ благодаря наличию трансмембранных доменов (TMD), закоренных в ЭПР, и C2-доменов (Ca²⁺/липид-связывающих), взаимодействующих с отрицательно заряженными фосфолипидами ПМ (Pitzalis, Heinlein, 2017). По аналогии с функцией E-SYT белков

млекопитающих, предполагается, что растительные SYT и МСТР могут действовать как сократительные кальций-связывающие белки-мостики, которые уменьшают расстояние между мембранами при связывании кальция. Исследование, проведенное в 2025 году Pérez-Sancho с соавторами, поставило под сомнения классическую модель регуляции межклеточного транспорта вследствие отложения каллозы, продемонстрировав, что в отсутствие МСТР белков точный контроль молекулярного транспорта через ПД нарушается, независимо от того, повышается или понижается уровень каллозы. На основании этих данных авторы полагают, что МСТР белки служат основными регуляторами открытия и закрытия ПД, работая независимо от каллозы (Pérez-Sancho et al., 2025). Авторы высказывают предположение, что отложение каллозы является скорее вспомогательным механизмом, обеспечивающим пластичность клеточных стенок для обеспечения транспорта крупных макромолекул, нежели чем основным механизмом регуляции транспорта через ПД.

По механизму возникновения ПД разделяют на первичные и вторичные. Первичные ПД образуются в конце клеточного деления во время цитокинеза, когда трубочки ЭПР встраиваются в развивающуюся клеточную пластинку. В процессе их образования играют белки ретикулоны RTNLB3 и RTNLB6, а также белки МСТР (Brault et al., 2019; Knox et al., 2015). Стоит отметить, что такие образовавшиеся после цитокинеза ПД, характеризуются крайне тесным МК ЭПР с ПМ и почти полным отсутствием просвета цитоплазматического рукава. Интересно, что несмотря на это, через такие ПД происходит очень эффективная диффузия малых молекул и даже неселективный транспорт макромолекул, что кажется нелогичным, исходя из их морфологии (Nicolas et al., 2017). Показано, что именно белки семейства МСТР играют важную роль в этом процессе и вновь образованные ПД с минимальным зазором между мембранами обогащены МСТР белками (Brault et al., 2019).

Вторичные ПД закладываются не во время деления, а образуются поперек зрелых клеточных стенок *de novo*, однако точный механизм этого процесса остается предметом дискуссий (Ehlers, Kollmann, 2001, Tee, Faulkner, 2024).

1.2. Транспортные белки

Ограниченность ППС ПД позволяет соседним клеткам растений пассивно обмениваться лишь небольшими молекулами (Tilsner et al., 2016), размеры которых

значительно меньше вирионов или вирусных рибонуклеопротеидных комплексов (ВРНП), поэтому вирусы используют активный механизм транспорта своего генома через ПД, который обеспечивается вирусными ТБ (Niehl, Heinlein, 2011). В ходе эволюции вирусы растений приобрели специализированные транспортные системы, состоящие из одного или нескольких ТБ, которые обеспечивают связывание вирусных геномов, их транспорт к ПД, а также увеличение ППС ПД для проникновения транспортной формы вирусного генома в соседнюю клетку (Morozov, Solovyev, 2020; Morozov, Solovyev, 2024). По механизму модификации ПД ТБ вирусов растений можно разделить на две основные группы (Niehl, Heinlein, 2011). ТБ, относящиеся к первой группе, увеличивают ППС ПД и обеспечивают перемещение комплекса ТБ с геномной нуклеиновой кислотой в соседние клетки, не вызывая при этом каких-либо видимых изменений структуры ПД (Niehl, Heinlein, 2011). К этой группе относятся вирусы родов *Tobamovirus*, *Dianthovirus*, *Benyvirus*, *Tobravirus*, *Tombusvirus*, *Poleovirus*, *Luteovirus*, *Closterovirus*, *Crinivirus*, *Carmovirus*, *Higrevirus*, *Potexvirus*, *Hordeivirus*, *Potyvirus* (Kumar, Dasgupta, 2021).

ТБ, относящиеся ко второй группе, вызывают радикальные изменения в структуре ПД, выстилая канал ПД своим ТБ и вытесняя десмотрубочку. По такому каналу, модифицированному вирусным белком, могут транспортироваться целые вирионы, достигающие 50 нм в диаметре (Niehl, Heinlein, 2011). К этой группе относятся вирусы родов *Umbravirus*, *Caulimovirus*, *Badnavirus*, *Nepovirus*, *Comovirus*, *Tospovirus* (Kumar, Dasgupta, 2021). Представителей семейства *Bromoviridae*, родов *Alfavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus* и *Ilarvirus*, часто выделяют в отдельную группу по способности модифицировать ПД, так как их ТБ обладают функциями, характерными для обеих вышеописанных групп (Kumar, Dasgupta, 2021). Однако следует отметить, что образование тубул, описанное для ТБ вирусов этих групп, было показано на протопластах и образование подобных структур не было воспроизведено в растениях, за исключением вируса мозаики люцерны (Kasteel et al., 1997; Lent van, Schmitt-Keichinger, 2006; Nurkiyanova et al., 2001; Wel Van Der et al., 1998). В связи с этим интересно отметить, что для хорошо изученного с точки зрения механизмов функционирования его ТБ вируса табачной мозаики также было показано образование тубулообразных структур в протопластах, однако в растениях подобная картина не наблюдается (Heinlein et al., 1998). У вирусов растений, кодирующих более одного ТБ, их гены, как правило, объединены в

консервативные модули, обеспечивающие скоординированный синтез всех белков транспортной системы.

1.2.1 Транспортные белки, кодируемые тройным блоком генов

В контексте данной работы необходимо сделать акцент на функциональной характеристике белков транспортной системы «тройного блока генов» (Triple Gene Block, TGB), эволюционно родственных объектам экспериментальной части этой работы. TGB представляет собой консервативный модуль из трех перекрывающихся генов, кодирующий набор белков, необходимых для транспорта и является одной из наиболее распространенных среди вирусов растений транспортных систем (Morozov, Solovyev, 2003). На основании сравнительного анализа TGB, кодируемые разными вирусами, разделяют на две основные группы: потекс-подобные (роды *Potexvirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Mandarivirus* и *Allexivirus*) и гордеи-подобные (роды *Hordeivirus*, *Pomovirus*, *Goravirus* и *Pecluvirus* (Morozov, Solovyev, 2003; Verchot-Lubicz et al., 2010). Вирусы, кодирующие потекс-подобные TGB, помимо всех транспортных белков, нуждаются также в белке оболочки (БО) для образования транспортно-компетентной формы вирусного генома, в то время как вирусы, кодирующие гордеи-подобные TGB транспортируются в виде комплекса геномной РНК с белком TGB1 (Kalinina et al., 2001; Verchot-Lubicz et al., 2010).

Белок TGB1 обеих групп обладает РНК-связывающей активностью и содержит домен NTPазы/хеликазы, ферментативная активность которого необходима для межклеточного транспорта. Хеликазный домен TGB1 относится к отдельной эволюционной ветви хеликаз суперсемейства I (SFI), куда входят так называемые «дополнительные» вирусные хеликазы, которые, как предполагается, возникли в ходе эволюции вследствие дупликации репликативной РНК-хеликазы (Morozov, Solovyev, 2003). Для TGB1 потекс-подобных TGB показана функция супрессии РНК-сайленсинга, которая необходима для межклеточного транспорта, а также показана способность увеличивать ППС ПД (Verchot-Lubicz et al., 2010). Белки TGB1, как правило, локализируются диффузно в цитоплазме и нуклеоплазме, но в присутствии других TGB-белков способны направляться к ПД (Wright et al., 2010; Zamyatnin et al., 2004). TGB1-белки гордеи-подобных TGB имеют дополнительный N-концевой домен, отсутствующий у потекс-подобных TGB, который участвует в системном транспорте вирусной инфекции через флоэму (Wright et al., 2010).

TGB2 и TGB3 представляют собой небольшие интегральные мембранные белки. Белки TGB2 относительно консервативны среди всех TGB-содержащих вирусов и имеют два мембранных домена с консервативной петлей между ними. Согласно предсказаниям, белок с такой структурой имеет U-образную топологию, при этом N- и C- концы обращены в цитоплазму, а гидрофильная петля - в полость ЭПР (Hsu et al., 2008; Lee et al., 2010). Последовательности TGB3 малоконсервативны, и размер белков TGB3 у разных вирусов варьирует в размерах от 7 до 24 кДа (Verchot-Lubicz et al., 2010). Белки TGB3 потекс-подобных TGB имеют один TMD, при этом N-конец белка обращен в полость ЭПР, а C-конец в цитоплазму. TGB3 гордеи-подобных TGB имеют два TMD, при этом N- и C-концы белка обращены в полость ЭПР, а центральная гидрофильная петля - в цитоплазму (Solovyev et al., 1996).

Общая модель, описывающая межклеточный транспорт вирусов, направляемый TGB обеих групп, выглядит следующим образом. Белок TGB1 за счет своей РНК-связывающей активности образует транспортно-компетентную форму вирусного генома, представляющую собой либо ВРНП, состоящие из ВРНК, связанной с TGB1, либо вирионы, ассоциированные одним концом с TGB1 белком. TGB1 в комплексе с ВРНК взаимодействует с белками TGB2 и TGB3, которые обеспечивают транспорт вирусного генома к ПД. Дальнейший транспорт вирусных геномов через ПД зависит от ферментативной активности TGB1, предположительно необходимой для изменения структуры транспортируемого ВРНП и/или внутренней структуры ПД (Solovyev et al., 2022). Детальные механизмы внутри- и межклеточного транспорта вирусов обеих групп, включая тесную связь этих процессов с репликацией, будут рассмотрены ниже (раздел 3.1.1 и 3.5), на примере типовых представителей обеих групп.

1.3. Репликация и транспорт вирусов растений сопряжены с ремоделированием клеточных мембран

Транспорт вирусов происходит в ассоциации с мембранами. В отличие от вирусов животных, которые в основном используют для транспорта секреторный путь, большинство вирусов растений могут транспортироваться и вне зависимости от секреторного пути, перемещаясь вдоль сети ЭПР-актин, тянущейся из клетки в клетку через ПД (Laliberté, Zheng, 2014). Репликация также ассоциирована с мембранами и происходит в специализированных мембранных ВРК, образованных в результате

модификации клеточных мембран вирусными белками (Wu, Cheng, 2020; Zhang et al., 2025). ВРК обеспечивают благоприятную для репликации среду, изолирующую вирусные нуклеиновые кислоты от клеточной машинерии сайленсинга (Wu, Cheng, 2020).

ВРК, образованные в одних и тех же клетках, могут отличаться по размерам и функциям. Так, многие вирусы образуют в зараженных клетках два типа ВРК (Wu, Cheng, 2020). Более крупные ВРК образуются на поздних стадиях инфекции и, как предполагается, связаны, преимущественно, со сборкой вирионов. А ВРК другого типа обычно имеют небольшие размеры, и их основная функция состоит в быстром установлении эффективного транспорта в соседние клетки на ранних стадиях инфекции. Такие ВРК могут быть подвижны и транспортироваться к ПД, где они заякореваются, или же могут образовываться у ПД *de novo*, где, как предполагается, они обеспечивают ко-репликационный транспорт дочерних вирусных геномов в соседние клетки (Heinlein, 2015; Kumar, Dasgupta, 2021; Wu, Cheng, 2020). Образование ВРК второго типа связано с включением в их состав ТБ, которые отвечают за взаимодействие этих структур с ПД (Laliberté, Zheng, 2014).

Ремоделирование мембран для образования ВРК обычно индуцируется одним или двумя вирусными белками, и их экспрессии в отсутствие других вирусных компонентов, как правило, достаточно для образования мембранных структур, аналогичных тем, которые индуцируются вирусами при инфекции (Laliberté, Zheng, 2014). Обычно этими белками выступают репликативные белки, как показано для большинства вирусов, и/или ТБ. Для этих белков характерно наличие доменов, необходимых для встраивания в мембрану (Laliberté, Zheng, 2014; Morozov, Solovyev, 2020; Zhang, Sanfaçon, 2006). Репликативные белки, участвующие в образовании ВРК, как правило содержат как минимум один ТМД, а в некоторых случаях взаимодействуют с мембранами благодаря наличию амфипатических спиралей, как это происходит у репликативных белков 1a BMV и p27 вируса некротической мозаики красного клевера (red clover necrotic mosaic virus, RCNMV) (Kusumanegara et al., 2012; Liu et al., 2009). Обычно такие белки также содержат функциональные домены, которые взаимодействуют с клеточными факторами, отвечающими за формирование и ремоделирование мембран (Laliberté, Zheng, 2014). Внутри- и межклеточный транспорт вирусов, который, как и репликация, функционально связан с мембранными структурами клетки, предполагает способность ТБ взаимодействовать с мембранами. Действительно, общим свойством ТБ, по всей

видимости, является наличие TMD или элементов структуры другого типа, ассоциированных с мембранами (Morozov, Solovyev, 2020). Например, у вирусов растений, которые кодируют только один ТБ, этот ТБ обычно содержит один или несколько гидрофобных доменов, обеспечивающих взаимодействие молекулы белка с мембранами. Связывание ТБ с мембранами может быть весьма сильным даже в отсутствие TMD. Например, до недавних пор считалось, что ТБ TMV и ТБ вируса некротической кольцевой пятнистости косточковых являются интегральными мембранными белкам, поскольку даже в жестких денатурирующих условиях они остаются в мембранной фракции (Martínez-Gil et al., 2009; Peiró et al., 2014), однако позднее было показано, что их гидрофобные домены не пронизывают мембрану насквозь, хотя и тесно ассоциированы с ней, и эта ассоциация является критической для межклеточного транспорта (Martínez-Gil et al., 2009; Peiró et al., 2014). Вирусы, кодирующие более одного ТБ, содержат в своей транспортной системе хотя бы один интегральный мембранный белок (Morozov, Solovyev, 2020).

При формировании ВРК вирусы могут использовать разные мембраны, входящие в состав эндомембранной системы клеток, и даже могут использовать мембраны таких органелл как митохондрии, хлоропласты и пероксисомы. Под эндомембранной системой клетки понимают совокупность взаимосвязанных и непрерывно взаимодействующих друг с другом мембранных органелл в цитоплазме клетки, которые работают как единый комплекс для синтеза, модификации, транспорта и деградации белков и липидов, и других клеточных метаболитов. Она включает ядерную мембрану и ЭПР, аппарат Гольджи и сеть транс-Гольджи, эндосомы, вакуоль и ПМ, связанные между собой везикулярным транспортом (Zhuang et al., 2024). ЭПР является самой большой мембранной органеллой клетки, простираясь по всему ее периметру и взаимодействуя посредством МК с эндосомами, митохондриями, пероксисомами, тонопластом, ПМ, а также хлоропластами и другими пластидами. ЭПР является местом синтеза множества белков и липидов, поддерживает коммуникацию между различными органеллами клетки, а также составляет основу ПД и тянется из клетки в клетку. Считают, что эти особенности ЭПР делают его платформой, наиболее часто используемой вирусами для образования ВРК и последующего ЭПР-ассоциированного внутри- и межклеточного транспорта (Laliberté, Zheng, 2014; Zhang et al., 2025). При этом почти все клеточные мембраны могут быть подвержены ремоделированию теми или иными вирусами. Более того, для многих

вирусов показана способность изменять свои «предпочтения» в зависимости от условий или стадий жизненного цикла (Zhang et al., 2025).

Прежде чем перейти к деталям и примерам ремоделирования клеточных мембран различными вирусами растений, необходимым для эффективной репликации и последующего ассоциированного с мембранами транспорта, целесообразным будет кратко рассмотреть общее строение мембранных компартментов растительной клетки.

2. Мембранные органеллы клетки

2.1. Плазматическая мембрана

ПМ образует барьер между клеткой и внеклеточным пространством, регулирующий транспорт и поддерживающий цитоплазматический гомеостаз. ПМ находится в тесном взаимодействии с окружающей клеточной стенкой с одной стороны и кортикальной ЭПР-актиновой сетью с другой. В ПМ находятся рецепторы, которые воспринимают изменения во внеклеточной среде и взаимодействуют со внеклеточными лигандами, преобразуя внешние стимулы в соответствующие ответы клетки (Gronnier et al., 2018).

Важным свойством ПМ является образование МК с ЭПР. У растений МК ПМ с ЭПР занимают порядка 5–10% всей площади ПМ независимо от стадии развития или типа клетки (McFarlane et al., 2017). Как упоминалось выше, особым типом таких контактов у растений являются ПД, где мембраны ЭПР и ПМ оказываются сближенными до расстояния 5-10 нм на протяжении всей длины канала ПД. МК характеризуются определенным белковым и липидным составом, необходимым для формирования и поддержания целостности этих структур (McFarlane et al., 2017). К белкам, участвующим в формировании МК между ЭПР и ПМ, помимо описанных выше SYT и MCTP, относятся также специфические для растений актин-связывающие белки NET (actin binding protein networked) и белки VAP27 (vesicle-associated membrane protein-associated protein 27) (Wang et al., 2014; Wang et al., 2023). МК ЭПР-ПМ участвуют в большом количестве процессов, включая иммунный сигналинг, реакции на внешние раздражители, эндоцитоз, аутофагию и стабилизацию сети кортикального ЭПР (Brandizzi, 2021).

2.2. Эндоплазматический ретикулум

ЭПР представляет собой плеоморфную мембранную структуру, образованную взаимосвязанными трубочками и цистернами, пронизывающую клетку от ядра до ПМ.

ЭПР участвует в синтезе, сворачивании и модификации по крайней мере трети клеточного протеома и синтезе незаменимых липидов, а также является местом хранения внутриклеточного кальция (Brandizzi, 2021; Kang et al., 2022; Pain et al., 2019). ЭПР обеспечивает пространственную организацию ферментных комплексов и компонентов сигнальных систем, позволяя эффективно координировать биохимические реакции (Jørgensen et al., 2005). Можно считать, что сеть ЭПР является единой в клетках растений, образующих симпласт, поскольку ЭПР соседних клеток соединен десмотрубочками (Brandizzi, 2021; Kang et al., 2022). Кроме того, как было сказано выше, ЭПР может контактировать с другими мембранными органеллами, включая митохондрии, эндосомы, хлоропласты и пероксисомы, через МК (Kang et al., 2022). Сеть ЭПР растительных клеток расположена преимущественно на периферии клетки, между ПМ и тонопластом, а также переходит в ядерную оболочку (Pain et al., 2019). Помимо этого, отдельные трансвакуолярные тяжи ЭПР (обычно один-два на клетку) пересекают клетку в виде пучка трубочек, проходящего через пространство, образованное в результате инвагинации тонопласта. Такие тяжи поддерживают связь между перинуклеарным и кортикальным ЭПР и способствуют перемещению метаболитов (Brandizzi, 2021).

ЭПР является высокодинамичной органеллой, меняющей свою структуру по мере роста клеток и необходимости синтезировать те или иные белки, а также в ответ на изменения физиологического состояния клетки и биотические или абиотические воздействия (Pastor-Cantizano et al., 2020). Динамическая структура ЭПР обусловлена балансом наличия двух морфологически различных субдоменов: листов (плоских участков липидного бислоя), которые образуют цистерны, и трубочек диаметром 40-55 нм (Kriechbaumer, Brandizzi, 2020). Иногда, помимо трубочек и цистерн, в качестве еще одного структурного субдомена ЭПР выделяют стабильные (сохраняющимися в течение не менее 5–10 с) точечные структуры внутри сети, представляющие собой МК ЭПР с ПМ (Griffing, 2018; Sparkes et al., 2009). Трубочки ЭПР состоят из мембран с высокой степенью кривизны, они соединяются друг с другом и с цистернами, образуя так называемые «трехсторонние соединения» — небольшие треугольные листы с отрицательно изогнутыми краевыми линиями (Kriechbaumer, Brandizzi, 2020). Кортикальный ЭПР преимущественно состоит из сети трубочек и цистерн, соединенных между собой трехсторонними соединениями, и морфологически отличается от перинуклеарного, который в большей степени состоит из цистерн, усеянных рибосомами

(Laliberté, Zheng, 2014). Структура ЭПР непрерывно ремоделируется под воздействием специализированных белков-формообразователей ЭПР, а также под действием актинового цитоскелета, играющего важнейшую роль в его функционировании (Kriechbaumer, Brandizzi, 2020). Движение ЭПР подавляется в отсутствие функционального актинового цитоскелета, хотя некоторое дезорганизованное движение можно обнаружить даже после обработки латрункулином В, ингибитором полимеризации актина (Pain et al., 2019). Это остаточное движение ЭПР при ингибировании функции актина, по всей видимости, обусловлено взаимодействием ЭПР с микротрубочками (МТ) (Hamada et al., 2014). Однако, в отличие от клеток животных, МТ вносят малый вклад в поддержание структуры ЭПР. Тем не менее показано, что разрушение МТ в клетках растений приводит к изменению длины некоторых трубочек ЭПР. Также известно, что некоторые трубочки ЭПР могут удлиняться вдоль уже существующих МТ в обоих направлениях (Hamada et al., 2014).

Корректная субдоменная организация ЭПР у растений поддерживается тремя семействами белков, обеспечивающими слияние, изгиб и стабилизацию мембран, которые включают атластин-подобные белки, ретикулон-подобные белки и белки Lunarpark (Kriechbaumer, Brandizzi, 2020).

Ретикулоны (reticulon-like, RTNL) – интегральные мембранные белки ЭПР, характеризующиеся наличием двух длинных гидрофобных районов, фланкирующих гидрофильную петлю и составляющих домен гомологии с ретикулоном (reticulon homology domain, RHD). Ретикулоны в мембране ЭПР имеют W-образную топологию с С- и N-концами, расположенными в цитоплазме, и действуют подобно шпилькам, встраиваясь в мембрану и локально изгибая ее (Nziengui, Schoefs, 2009). При этом способность ретикулонов к олигомеризации в мембранах обеспечивает их высокую концентрацию на единицу площади мембраны и лежит в основе механизма, с помощью которого они искривляют мембраны, образуя участки с высокой степенью кривизны (Sparkes et al., 2010). Белки RTNL необходимы для поддержания тубулярной структуры ЭПР, а в цистернах эти белки располагаются по их краям в участках с высокой степенью кривизны, и при повышенной экспрессии способны преобразовывать цистерны в трубочки (Brandizzi, 2021; Sparkes et al., 2009; Tolley et al., 2010). Для *Arabidopsis* охарактеризован 21 ретикулон, два из которых, RTNL3 и RTNL6, участвуют в

формировании десмотрубочек в составе ПД, которые являются клеточными мембранами с самой высокой степенью кривизны (Tilsner, Kriechbaumer, 2022).

Белки семейства Lunapark (LNP) обеспечивают формирование листов ЭПР. Это консервативные мембранные белки, которые содержат два N-концевых TMD домена и домен цинковых пальцев на C-конце, за которым следует последовательность LNPARK, которая консервативна у млекопитающих, но у растений имеет некоторую вариабельность (Kriechbaumer et al., 2018). По некоторым данным, белки LNP локализируются в трехсторонних соединениях и играют роль в их стабилизации (Chen et al., 2015). Повышенная экспрессия белков LNP в эпидермальных клетках листьев табака вызывает образование цистерн дозозависимым образом. Мутанты с нокаутом *lnp1/lnp2* имеют значительно меньшую площадь цистерн и увеличенный размер полигональных областей (Kriechbaumer et al., 2018).

Атластин-подобные белки растений представляют собой ГТФазы, участвующие в слиянии трубочек ЭПР (Liu et al., 2012). Предполагается, что ГТФазные домены атластинов димеризуются, когда белки двух отдельных трубочек ЭПР находятся в непосредственной близости. Это приводит к взаимодействию и, затем, слиянию мембран, которому способствует C-концевой цитоплазматический α -спиральный домен атластинов (Liu et al., 2012; Moss et al., 2011). У растений атластин-подобная ГТФаза ROOT HAIR DEFECTIVE 3 (RHD3) действует как ортолог атластина-1 млекопитающих. Повышенная экспрессия доминантно-негативных мутантов белка RHD3 или нокаун RHD3 приводит к образованию сети ЭПР с повышенным количеством очень длинных, неразветвленных трубочек и значительному уменьшению количества полигональных структур, что может быть связано с ингибированием слияния трубочек ЭПР (Brandizzi, 2021).

2.3. Аппарат Гольджи

В клетках растений аппарат Гольджи (АГ) представляет собой многочисленные дискретные стопки из цистерн, которые активно перемещаются вдоль цитоскелета (Voevink et al., 1998). АГ выполняет такие функции как синтез и транспорт полисахаридов клеточной стенки, а также участвует в транспорте и модификации гликопротеинов, поступающих из ЭПР, сортируя их в зависимости от того, для каких компартментов клетки они предназначены. Цистерны, являющиеся структурной единицей аппарата Гольджи, различаются по биохимическим свойствам и функциям, поскольку содержат

различные ферменты, распределенные вдоль стопки поляризованным образом, что позволяет осуществлять последовательную модификацию субстратов (Zhuang et al., 2024). На основании расположения, морфологии и функций цистерны в аппарате Гольджи разделяют на три отдела. Цистерны цис-Гольджи располагаются на расстоянии всего несколько сотен нм от ЭПР, принимают из него секреторные грузы и направляют в медиальный Гольджи, откуда они направляются в более отдаленный от ЭПР транс-Гольджи. Транс-отдел аппарата Гольджи плавно переходит в сеть транс-Гольджи (trans-Golgi network, TGN), представляющую собой совокупность трубочек и везикул, где происходит сортировка модифицированных грузов (Kang et al., 2022).

Транспорт из ЭПР в АГ опосредуется белками комплекса COPII. Комплекс COPII представляет собой набор функционально консервативных белков, которые включают в себя интегральный мембранный белок - фактор обмена гуаниновых нуклеотидов Sec12 (GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR, GEF Sec12), а также цитозольную малую ГТФазу Sar1 (secretion-associated Ras-related protein 1) и компоненты оболочки COPII: Sec23/24 и Sec13/31. Экспорт грузов из ЭПР происходит в специализированных областях, куда привлекаются белки COPII, называемых сайтами экспорта из ЭПР (endoplasmic reticulum export sites, ERES) (Hanton et al., 2009; Kania et al., 2018). Активация Sar1 в участках ERES, происходящая с помощью GEF Sec12, инициирует сборку COPII-комплексов (Aniento et al., 2022; Kania et al., 2018). Механизм, благодаря которому грузы попадают из ERES в АГ, является предметом дискуссий. Одна из последних моделей ЭПР-Гольджи транспорта предполагает, что участки ERES с привлеченными COPII белками способны перемещаться вдоль мембраны ЭПР, собирая необходимые синтезированные de novo белки и начиная формировать везикулы. Затем такие COPII-содержащие ERES вместе с грузом временно захватываются стопкой Гольджи, где COPII-везикулы отпочковываются от ERES и сливаются с цистерной цис-Гольджи, после чего ERES высвобождаются из стопок Гольджи для рециркуляции (Aniento et al., 2022; Takagi et al., 2020). Ретроградный транспорт грузов из аппарата Гольджи в ЭПР, а также транспорт из транс- в цис-Гольджи, опосредуется везикулами COPI. COPI комплекс представляет собой набор белков, включающих малую ГТФазу ARF1 (ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1), ARF-GEF фактор резистентности Гольджи к брефельдину 1 (GOLGI BREFELDIN A RESISTANT GUANINE EXCHANGE FACTOR 1, GBF1), и F-комплекс, состоящий из семи субъединиц (α , β , β' , γ , δ , ϵ , ζ) (Aniento et al., 2022). Подобно

работе комплекса COPII, малая ГТФаза ARF1 активируется ARF-GEF и инициирует образование везикул, привлекая F-комплекс (Hsu, Yang, 2009). Домен ЭПР, в котором везикулы COPI сливаются с мембраной ЭПР называются сайтами импорта в ЭПР (endoplasmic reticulum import sites, ERIS). Интересно, что они, по-видимому, локализируются рядом с сайтами ERES в мембране ЭПР непосредственно под цистерной цис-Гольджи, создавая таким образом двунаправленные транспортные потоки на границе ЭПР-Гольджи, что согласуется с моделью транспорта, описанной выше (Chowdhury et al., 2020; Takagi et al., 2020).

2.4. Сеть транс-Гольджи

После модификации грузов в АГ они отправляются в TGN, которая у растений обычно выделяется как отдельный компартмент, и представляет собой сеть трубочек и везикул, где происходит сортировка модифицированных грузов для направления по двум разным транспортным путям - к ПМ или вакуоли (Rosquete et al., 2018). TGN образуется путем отпочковывания больших цистерн транс-Гольджи и встречается в двух видах – в виде TGN-GA, еще ассоциированного с АГ и расположенного со стороны его транс-отдела, и TGN-GI, которые физически отделены от стопок АГ и, таким образом, являются независимыми органеллами (Rosquete et al., 2018; Zhuang et al., 2024). Эти субпопуляции TGN играют различную роль в транспорте: TGN-GA участвует как в эндоцитозном, так и в секреторном путях, а GI-TGN в основном участвует в секреции (Kang et al., 2022). Таким образом, в рамках anterograde транспорта, то есть транспорта от места синтеза к месту нахождения и функционирования, белки и липиды, синтезированные в ЭПР, сначала обычно транспортируются в везикулах в АГ, затем в TGN, а оттуда либо в ПМ, либо в вакуоль. TGN также участвует в транспортировке и рециркуляции эндосомального материала от ПМ и функционирует как ранняя эндосома, находясь на стыке секреторного и эндоцитозного путей (Viotti et al., 2010). Так, в рамках retrograde пути, при эндоцитозе рецепторов ПМ, грузы из ПМ транспортируются клатрин-зависимым образом в TGN, выполняющую функции ранней эндосомы, а затем сортируются и могут либо отправляться обратно в ПМ, либо упаковываются в интралюминальные везикулы (intraluminal vesicles, ILV) в составе мультивезикулярных телец (multivesicular bodies, MVB), также известных как поздние эндосомы, и направляются для деградации в вакуоль (Aniento et al., 2022). Таким образом, TGN и MVE – это два типа растительных эндосом,

ранние и поздние, соответственно, которые находятся в постоянном движении и могут быть обнаружены в виде субпопуляций на разных стадиях созревания. Следует отметить, что известны и другие пути и ретроградного и anterogradного транспорта (Viotti et al., 2010).

Основными компонентами, необходимыми для индукции образования покрытых клатрином везикул, участвующих в транспорте грузов от ПМ в TGN и MVE, являются белки семейства тяжелых и легких цепей клатрина и адаптерные белки (такие как adaptor-protein-2 (AP-2) и комплекс TPLATE). Динамин-подобные белки (Dynamin-Related Proteins, DRP1 и DRP2) обеспечивают отпочковывание покрытых клатрином везикул (Agaoua et al., 2021).

Сортировка эндосомальных грузов и формирование ILV контролируется комплексом сортировки эндосом необходимым для транспорта (endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT), который представляет собой многосубъединичный комплекс ремоделирования мембран, способный формировать Ω -образные инвагинации мембраны MVB, которые затем отпочковываются в виде ILV в просвет MVB (Gao et al., 2017). Комплекс ESCRT консервативен у всех эукариотических организмов и хорошо описан у дрожжей и млекопитающих, а у растений описан недавно, в основном по сходству последовательностей его белковых компонентов. Комплекс ESCRT делится на пять небольших комплексов: ESCRT-0, I, II и III и комплекс сортировки вакуолярных белков 4 (VPS4) (Agaoua et al., 2021).

Слияние мембран во время везикулярного транспорта обеспечивается с помощью комплекса слияния (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor, SNARE). Индукция слияния мембран происходит благодаря взаимодействиям между «комплементарными» белками SNARE, локализованными на мембране везикулы и на мембране целевой органеллы. После контакта белки SNARE образуют стабильный белковый комплекс, в процессе формирования которого происходит сближение и слияние двух мембран. И хотя слияние мембран с при участии белков SNARE является общим механизмом, консервативным для растений, дрожжей и животных, у растений эта система включает особенно много белков. К настоящему времени у *Arabidopsis thaliana* идентифицировано 56 представителей семейства SNARE (Agaoua et al., 2021).

2.5. Тонoplast

Тонoplast, мембрана вакуоли, является частью эндомембранной системы растительных клеток и отделяет цитоплазму от просвета вакуоли. Вакуоли делят в зависимости от их функций на два типа: литические вакуоли, являющиеся преобладающей формой у растений, часто считающейся эквивалентом лизосом животных, которые осуществляют такую важную функцию как аутофагия; и вакуоли для хранения белка, которые, преимущественно, встречаются в семенах и служат резервуарами питательных веществ во время прорастания (Kang et al., 2022). Вакуоли очень динамичны, и их морфология меняется в зависимости от условий окружающей среды и варьирует на разных стадиях развития растения. Вакуолярный транспорт регулируется как содержанием в мембране тонoplastа специфических белков (малые ГТФазы Rab5, рецепторы, SNARE, белки-транспортеры и ионные каналы), так и специфическим липидным составом, обеспечивающим подходящее микроокружение для мембранных белков тонoplastа (Zhang et al., 2015).

2.6. Ядерная оболочка

Ядерная оболочка окружает ядро и изолирует ядерный геном. Структурно она состоит из наружной и внутренней ядерных мембран, каждая из которых содержит различные наборы белков, которые делают ядерную мембрану платформой для разнообразных функций и коммуникации. Наружная мембрана является частью и непосредственно переходит в ЭПР, образуя непрерывную систему, где пространство между двумя ядерными мембранами (перинуклеарное пространство) продолжается в люмен ЭПР (Kang et al., 2022). В ядерной оболочке имеется множество ядерных пор, в которых внешняя и внутренняя мембраны соединяются, образуя отверстия с внешним диаметром порядка 120 нм. Центральный канал ядерных пор является более узким; в нем находится сложный многокомпонентный белковый комплекс, включающей белки-нуклеопорины, которые способны взаимодействовать с ядерными транспортными рецепторами (импортином и экспортином), которые участвуют в селективном транспорте различных грузов через комплекс ядерной поры (Kang et al., 2022).

2.7. Пероксисомы

В пероксисомах происходят различные окислительные реакции, необходимые для метаболических и сигнальных функций; мембрана пероксисомы изолирует их от остальных компартментов клетки, чтобы снизить потенциальный риск повреждения при окислительном процессе (Kao et al., 2018). Обычно количество пероксисом увеличивается вследствие роста и деления уже существующих органелл, но новые пероксисомы могут возникать и путем отпочковывания от мембран ЭПР (Kao et al., 2018; Pan et al., 2020). Транспорт в пероксисомы различных липидных субстратов и кофакторов обеспечивается мембранными транспортерами пероксисом (Charton et al., 2019; Plett et al., 2020), тогда как транспорт белков происходит при узнавании одного из двух сигналов транспорта в пероксисомы (PTS1 и PTS2) цитозольными рецепторами (Pan et al., 2020). Пероксисомы растений участвуют в большом спектре различных физиологических процессов и особенно на раннем этапе развития растений, когда проростки зависят от расщепления липидов до начала фотосинтеза, а также играют ключевую роль в фотодыхании, метаболизме активных форм кислорода (АФК) и азота на протяжении всего развития растения (Pan et al., 2020).

Раньше пероксисомы рассматривались как простые органеллы небольшого размера, имеющими одну мембрану. Однако недавние исследования идентифицировали более сложное их устройство и наличие многочисленных внутренних мембран (Kang et al., 2022). Было показано, что пероксисомы имеют внешнюю мембрану, окружающую люменальное пространство, которое содержит импортируемые матричные белки, выполняющие ферментативные функции пероксисом, а также связанные с мембраной везикулы, свободные от матричных белков. Подобная организация приводит к образованию по крайней мере трех отдельных пространств внутри пероксисом, потенциально содержащих специфические белки, субстраты и кофакторы (Wright, Bartel, 2020). Была показана физическая связь пероксисом с другими органеллами клетки - хлоропластами, митохондриями и ЭПР (Kang et al., 2022). При взаимодействии с этими органеллами пероксисомы могут изменять форму или даже образовывать специальные выступы до 15 мкм в длину - пероксулы, чтобы увеличивают площадь поверхности взаимодействия (Mathur, 2020). Так, на свету пероксисомы, ассоциированные с хлоропластами, вытягиваются в эллиптическую форму по сравнению со сферической формой в темноте (Oikawa et al., 2015). Митохондрии также могут располагаться в

непосредственной близости от пероксисом и хлоропластов на свету, что согласуется с их метаболической ролью. Показано также, что пероксисомы активно ассоциируют с митохондриями в условиях стресса, что может быть важно для нейтрализации АФК (Oikawa et al., 2015).

2.8. Митохондрии

Митохондрии обеспечивают производство значительной часть аденозинтрифосфата (АТФ) в клетке посредством окислительного фосфорилирования. Они также обеспечивают метаболизм некоторых аминокислот, липидов, нуклеиновых кислот и веществ, необходимых для синтеза фитогормонов. Митохондрии контролируют окислительно-восстановительный баланс при фотосинтезе, играют роль в сигналинге и реакциях, связанных с защитным ответом (Kang et al., 2022).

Митохондрии окружены внешней и внутренней мембраной, и в результате такой организации в органелле формируется четыре функциональных пространства: внешняя мембрана, межмембранное пространство, внутренняя мембрана и митохондриальный матрикс. Наружная мембрана митохондрий отделяет митохондрии от цитоплазматического матрикса. Внешняя мембрана не только инкапсулирует внутреннюю мембрану, но и иногда простирается в цитозоль, и другие органеллы. Иногда такие отростки могут отщепляться, образуя небольшие везикулоподобные структуры (Yamashita et al., 2016). Внутренняя мембрана митохондрий растений содержит белковые комплексы, участвующие в цепи переноса электронов, которая создает протонный градиент в межмембранном пространстве для стимулирования выработки АТФ АТФ-синтазой (Tang, Zhu, 2022).

Структуры, образуемые внутренней мембраной, можно разделить в соответствии с их различными функциями на внутреннюю пограничную мембрану, которая близка к внешней мембране и параллельна ей, и мембраны крист, которые образуются путем инвагинаций внутренней мембраны в сторону матрикса, что увеличивает площадь поверхности окислительного фосфорилирования (Kang et al., 2022). Кристы являются основным местом окислительного фосфорилирования и содержат комплексы дыхательной цепи и АТФ-синтазу, которая занимает порядка 8,5 % от общего объема внутренней мембраны. Считается, что димеры АТФ-синтазы способствуют кривизне мембран крист (Zancani et al., 2020).

Митохондрии активно движутся вдоль актиновых филаментов, при этом они могут менять скорость, а также форму на более удлинённую, чтобы сближаться и взаимодействовать с другими органеллами в ответ на различные стимулы, например, свет. Кроме того, количество митохондрий постоянно меняется вследствие процессов слияния и деления, меняется их белковый и липидный состав в ответ на различные потребности развития или сигналы окружающей среды (Kang et al., 2022). Подвижность ЭПР также способствует слиянию митохондрий и изменению их формы. Было показано, что тесная связь между ЭПР и митохондриями важна для синтеза и транспорта липидов, а также для поддержания нормальной морфологии митохондрий (Kang et al., 2022). У растений митохондрии часто группируются вокруг хлоропластов, где также обнаруживаются и пероксисомы. Эта взаимосвязь между органеллами может быть одним из эффективных путей обмена метаболитами внутри растительных клеток (Tang, Zhu, 2022).

2.9. Пластиды. Хлоропласты

Пластиды — это специализированные для растений мембранные органеллы, среди которых по морфологии и функциям выделяют протопластиды (недифференцированные предшественники пластид), амилопласты (запасающие крахмал), элайопласты (запасающие липиды), хромопласты (содержащие не зелёные пигменты), геронтопласты (стареющие пластиды), этиопласты (развивающиеся пластиды) и хлоропласты (содержащие зелёный пигмент хлорофилл) (Rolland et al., 2018). Хлоропласты - уникальные фотосинтетические органеллы, которые, благодаря наличию хлорофилла, эффективно поглощают энергию солнечного света и преобразуют ее в перенос электронов и протонный градиент, которые приводят к образованию первичных энергетических эквивалентов NADPH и АТФ. Хлоропласты способны эффективно направлять эти эквиваленты в ряд анаболических реакций в строме хлоропласта, включая синтез сахаров, липидов, аминокислот, нуклеотидов, пигментов, гормонов и витаминов, и экспортировать продукты реакций синтеза в цитоплазму (Kirchhoff, 2019). Хлоропласты, в отличие от других пластид, помимо внешней и внутренней мембраны имеют еще и крайне развитую систему внутренних мембран – тилакоиды, объединенные в стопки – граны, соединенные отдельными тилакоидами (Rolland et al., 2018). Такая организация хлоропластов приводит к образованию трех отдельных водных

компарментов: межмембранное пространство между двумя мембранами оболочки; строму хлоропласта между внутренней мембраной оболочки и мембраной тилакоида; и люмен тилакоида, окруженный мембраной тилакоида (Kirchhoff, 2019). В строме хлоропласта происходят все так называемые светонезависимые метаболические реакции, а система тилакоидных мембран является местом для светозависимых реакций оксигенного фотосинтеза. Складчатая структура тилакоидов позволяет значительно увеличить площадь поверхности для размещения компонентов, участвующих в фотосинтезе (Rolland et al., 2018).

3. Ремоделирование клеточных мембран (+)РНК-содержащими вирусами растений

Вирусы с геномной РНК положительной полярности представляют собой наиболее многочисленную группу вирусов растений. (+)РНК-содержащие вирусы реплицируются в цитоплазме, поэтому для них критически важным является ремоделирование клеточных мембран для образования ВРК, обеспечивающее образование защищенных компарментов для репликации вирусного генома (Jin et al., 2018). Изучение структур и механизмов биогенеза ВРК, а также идентификация клеточных и вирусных белков, участвующих в их образовании, является важной задачей фитовирусологии. В последнее время прогресс в технологиях трехмерной визуализации субклеточных структур позволил визуализировать мембранные структуры, индуцируемые вирусами, в высоком разрешении. Характеристики трехмерных структур различных мембранных ВРК позволили лучше понять среду, создаваемую вирусами для репликации, а также разобраться в организации и пространственном разделении различных процессов жизненного цикла вирусов. Несмотря на происхождение из разных клеточных мембран, трехмерные структуры ВРК обнаруживают морфологическое сходство среди разных семейств вирусов. Они могут быть представлены разветвленной сетью взаимосвязанных мембран, состоящей из сферических одно- и/или двухмембранных везикул, различных инвагинаций и сферул, а также других структур, позволяющим увеличить общую площадь поверхности мембран в ВРК (Рис. 1) (Jin et al., 2018; Laliberté, Zheng, 2014). Тем не менее, текущие знания о трехмерной структуре ВРК носят преимущественно описательный характер и многие вопросы остаются без ответа. Так, для многих вирусов были детально охарактеризованы трехмерные структуры их ВРК, описаны белки,

участвующие в биогенезе ВРК, но динамические изменения мембранной организации, связывающие их репликацию с внутри- и межклеточным транспортом вируса остаются почти неизученными. Данная глава посвящена обзору актуальных данных о структурной перестройке клеточных мембран, индуцируемой различными представителями (+)РНК-содержащих вирусов растений при биогенезе ВРК, а также рассматривает механизмы внутри- и межклеточного транспорта вирусных геномов от мест репликации.

3.1. Вирус-индуцированное ремоделирование мембран ЭПР

3.1.1. X вирус картофеля

X вирус картофеля (Potato virus, PVX) – представитель рода *Potexvirus*, семейства *Alphaflexiviridae*. PVX содержит TGB, который кодирует белки, принимающие непосредственное участие в ремоделировании мембран ЭПР и образовании репликативных мембранных компартментов (Рис. 1В). На основании структуры, функций и стадии жизненного цикла вируса, на которой они возникают, ВРК PVX можно разделить на два типа. Крупные перинуклеарные тела, называемые X-телами, образуются на поздних стадиях инфекции и являются характерной, хотя и не строго обязательной структурой при инфекции PVX, значительно увеличивающей продуктивность инфекции (Tilsner et al., 2013). Второй тип ВРК, образующихся при инфекции PVX - мобильные, которые способны двигаться к ПД и закрепляться у них, образуя РАМВs. В обоих типах ВРК обнаруживается вирусная репликаза и происходит активная репликация; однако, надо отметить, что структуры, напоминающие X-тела и РАМВs могут образовываться и при временной экспрессии TGB-белков в отсутствие вирусной инфекции (Tilsner et al., 2013). Для репликазы PVX была показана способность к олигомеризации и образованию производных от ЭПР мелких структур, которые могут рассматриваться в качестве первичных ВРК (Solovyev et al., 2022). Репликаза рекрутирует в такие первичные ВРК белок TGB2 посредством прямого взаимодействия с ним. TGB2 способствует дальнейшей реорганизации мембраны ЭПР, индуцирует образование везикул, содержащих также белок TGB3, в которые рекрутируется и белок TGB1 (Ju et al., 2005; Samuels et al., 2007; Wu et al., 2019). Образованные ВРК могут становиться мобильными, двигаться по направлению к ПД, накапливаться и закрепляться у них, либо, на поздних стадиях инфекции, ВРК могут группироваться в перинуклеарной области и организовываться при участии TGB1 в большое X-тело (Рис. 1В) (Tilsner et al., 2013). Мобильные ВРК, как предполагается, направляются к ПД белком TGB3 вдоль ЭПР-

актиновой сети (Schepetilnikov et al., 2005; Solovyev et al., 2022). Заякоренные у ПД ВРК вызывают дальнейшую пролиферацию мембран ЭПР и образование модифицированных TGB-белками, высоконденсированных мембранных структур - РАМВs (Tilsner et al., 2013). Периферические тельца закрывают устья ПД и представляют собой индуцированные вирусом компартменты, в которых происходит активная репликация и, возможно, трансляция, которые оптимизируют процессы репликации и транспорта, обеспечивая корепликационную вставку ВРНП в ПД для транспорта в соседние клетки (Tilsner et al., 2013). Было показано, что TGB1, привлекаемый белками TGB2 и TGB3, необходим для того, чтобы направить БО, который в свою очередь связывается с ВРНК, в канал ПД. Таким образом, сразу после синтеза ВРНК в РАМВs, и образования ВРНП, эти комплексы направляются в канал ПД белком TGB1 для транспорта в соседнюю клетку (Solovyev et al., 2022). С одной стороны, способность увеличивать ППС ПД показана для TGB1 PVX (Howard et al., 2004). В то же время в этой функции может участвовать белок TGB2 который через взаимодействие с клеточными TIR белками, способен активировать β -1,3-глюкоказы, ответственные за деградацию каллозы в ПД (Fridborg et al., 2003; Tamai, Meshi, 2001). Кроме того, TGB2, возможно, может увеличивать ППС ПД напрямую, так как для него была показана способность индуцировать, подобно ретикулонам, сужение трубочек ЭПР (Lazareva et al., 2021a). Это же его свойство, вероятно, способствует ремоделированию мембран для создания ВРК.

В то время как о строении РАМВs мало что известно, ультраструктура и механизм образования X-тел были описаны. Считается, что в образовании X-тел на поздних стадиях инфекции важную роль играет белок TGB1, выполняя в них структурную роль (Tilsner et al., 2012). TGB1 образует слоистые агрегаты, составляющие основу X-тел, рекрутирует актиновые филаменты и способствует реорганизации ЭПР (Рис. 1B) (Tilsner et al., 2012). Вокруг агрегатов, образованных TGB1, постепенно накапливаются ВРК, образованные репликацией, TGB2 и TGB3 из мембран ЭПР (Ju et al., 2005; Linnik et al., 2013; Samuels et al., 2007). ВРК, накапливающиеся вокруг TGB1-кора, структурно представляют собой агрегаты репликазы и дцРНК, плотно покрытые белком TGB2, подобно кольчуге, к которым TGB2 рекрутирует TGB3. На периферии X-тела локализуются вирионы (Рис. 1B). Образование X-тел связано с поздними стадиями инфекции, когда уже практически не происходит межклеточного транспорта вируса, но происходит активная продукция дочерних вирионов (Tilsner et al., 2012). Известно, что TGB1 PVX может

функционировать как активатор трансляции, связывая субъединицы БО на 5'-конце вирусных частиц и дестабилизируя их (Atabekov et al., 2000; Karpova et al., 2006). Поэтому, возможно, для облегчения процессов сборки вирионов на поздних этапах инфекции вирусу выгодно сгруппировывать TGB1 в агрегаты, чтобы пространственно разграничить TGB1 и образующиеся вирионы для увеличения продукции последних. Интересно, что белки TGB1 других потексвирусов также образуют агрегаты, и для многих потексвирусов показано образование аналогичных X-телам структур, окруженных накапливающимися вирионами, что указывает на возможный консервативный механизм регуляции сборки вирионов потексвирусов, которые транспортируются в инкапсидированной форме (Chang et al., 1997; Rouleau et al., 1994).

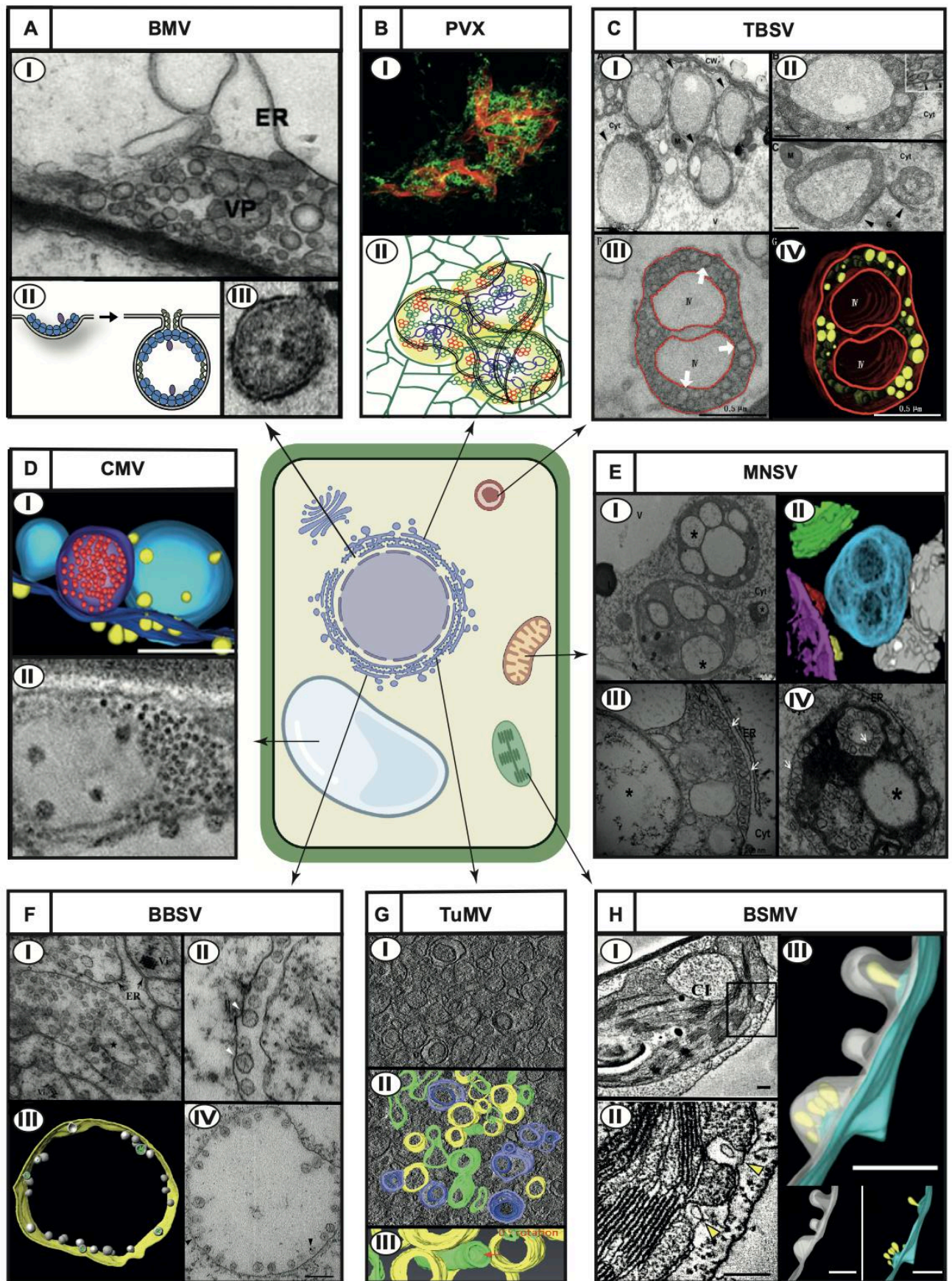


Рисунок 1. Ремоделирование клеточных мембран вирусами растений.

А. Ремоделирование мембран ЭПР для образования ВРК при инфекции BMV. (А-I) ТЭМ изображение характерного при инфекции BMV везикулярного пакета (VP), образованного из ЭПР (ER) в клетках *N. benthamiana*. Внутри везикулярного пакета визуализируется набор сферул, окруженных ЭПР (адаптировано из Vatunusinghe et al., 2011). **(А-II)** схема образования сферул BMV из мембран ЭПР благодаря самовзаимодействию множеству копий белка 1a (адаптировано из Diaz, Wang, 2014). **(А-III)** Приближенное изображение сферулы, из области на рисунке А-I.

В. Ремоделирование мембран ЭПР для образования ВРК при инфекции PVX. (ВI) Изображение вирус-индуцированного мембранного компартмента в клетках *N. benthamiana*, агроинфильтрированных для экспрессии GFP-TGB2 и TGB1-mRFP, полученное с помощью конфокальной флуоресцентной 3D-sim микроскопии. **(ВII)** – схема, иллюстрирующая строение X-тела при инфекции PVX. (Адаптировано из Linnik et al., 2013). Неинкапсидированная вирусная РНК (желтая) окружает структуры, образованные TGB1 (фиолетовые). ЭПР (зеленый) ремоделируется белком TGB2 в мембранные тельца, которые также содержат TGB3 (красный). Вирионы (черные) накапливаются на периферии.

С. Ремоделирование мембран пероксисом для образования ВРК при инфекции TBSV. (С-I) ТЭМ изображения листьев *N. benthamiana*, зараженных TBSV. Наблюдаются многочисленные рMVBs, образованные из пероксисом. **(СII)** Приближенные изображения рMVB. (С-I, С-II - адаптировано из McCartney et al., 2005). **(С-III)** ТЭМ изображение и **(С-IV)** 3D-реконструкция модифицированных пероксисом. Сферулы изображены желтым, мембраны пероксисом – красным. (Адаптировано из Incarbone et al., 2020).

Д. Ремоделирование тонопласта и MVB для образования ВРК при инфекции CMV. (D-I) 3D-реконструкция вирус-индуцированные сферических мембранных образований в клетках *N. benthamiana*, инфицированных CMV. Сферические образования происходящие из тонопласта (синий) или MVB (голубой), и образованные в них сферулы (желтый). Фиолетовым обозначен мембранный компартмент, содержащий вирусные частицы (красные). **(D-II)** срез томограммы MVB с рисунка D-I. (Адаптировано из Wang et al., 2021b).

Е. Ремоделирование мембран митохондрий для образования ВРК при инфекции MNSV. (E-I) ТЭМ изображение листьев *N. benthamiana*, инфицированных MNSV. Визуализируются измененные митохондрии с расширенными кристами и разделением внешней митохондриальной мембраны (звездочка). **(E-III), (E-IV)** Приближенные изображения, где видны сферулы внутри больших расширений по периферии митохондрий. **(E-II)** 3D-реконструкция ремоделированной митохондрии (синяя) рядом с хлоропластом (зеленый) и другими измененными митохондриями (желтый, красный и фиолетовый). (Адаптировано из Gomez-Aix et al., 2015).

Ф. Ремоделирование мембран ЭПР для образования ВРК при инфекции BBSV. (F-I), (F-II), (F-IV) ТЭМ фотографии, инфицированных BBSV клеток *N. benthamiana*. Визуализируются везикулярные пакеты, содержащие большое количество сферул, связанных с мембраной ЭПР. **(F-III)** 3D-модель индуцированных BBSV-сферических образований, желтым обозначена внешняя мембрана ЭПР. (Адаптировано из Cao et al., 2015).

Г. Ремоделирование мембран ЭПР для образования ВРК при инфекции TuMV. (G-I) один срез томограммы мембранных структур, индуцированных TuMV в клетках *N. benthamiana*. **(GII)** 3D реконструкция. Одномембранные структуры (желтый), промежуточные структуры (зеленый) и двумембранные структуры (голубой – внешние мембраны; синий – внутренние мембраны). **(GIII)** Увеличенное изображение, повернутое на 43,2°, подчеркивающее трубчатую природу мембранных образований. (Адаптировано из Wan et al., 2015).

Н. Ремоделирование мембран хлоропластов для образования ВРК при инфекции BSMV. (H-I) срез томограммы. В хлоропластах наблюдаются индуцированные BSMV периферические инвагинации и большие цитоплазматические инвагинации (CI). **(H-II)** увеличенные изображения инвагинаций. Желтые стрелки показывают периферические инвагинации со сферулами внутри. **(HIII)** 3D реконструкция. Внешняя мембрана хлоропласта - голубая; внутренняя - белая; сферулы, происходящие из внешней мембраны - желтые. (Адаптировано из Jin et al., 2018).

3.1.2. Вирус табачной мозаики

Вирус табачной мозаики (*Tobacco mosaic virus*, TMV) - представитель рода *Tobamovirus*, семейства *Virgaviridae*. Как ни парадоксально, для классического объекта фитовирусологии – TMV, не существует современных исследований, касающихся изучения трехмерной структуры его ВРК, хотя компоненты, участвующие в их образовании, хорошо известны. Тем не менее ряд исследований 2000-х годов позволяет в общих чертах описать трехмерную структуру ВРК TMV. Во время инфекции TMV происходит ремоделирование мембраны ЭПР при участии вРНК, репликативных белков и ТБ приводящих к образованию ВРК. При этом трубочки кортикального ЭПР преобразуются в кластеризованные пластинчатые цистерны, а ТБ TMV накапливается в виде нитевидных структур, соединенных с этими цистернами, однако присутствует ли непрерывная поверхность ЭПР вокруг этого образования различить не удастся (Asurmendi et al., 2004; Berg, Beachy, 2008; Reichel, Beachy, 1998). Участки, содержащие вирусную репликазу обнаруживаются как внутри, так и на периферии ВРК. В крупных тельцах, которые наблюдаются на поздних стадиях инфекции, обнаруживается также БО (предположительно, в виде вирионов) на периферии ВРК (Asurmendi et al., 2004; Berg, Beachy, 2008; Reichel, Beachy, 1998).

Репликация TMV зависит от двух белков – вспомогательного репликативного белка 126К, содержащего метилтрансферазный и хеликазный домены, и репликазы 183К, которая синтезируется путем проскока терминирующего кодона 126К и содержит дополнительно полимеразный домен, непосредственно осуществляющий репликацию, в то время как белок 126К является вспомогательным и значительно увеличивает эффективность этого процесса (Ishibashi, Ishikawa, 2016). Образование ВРК и репликация TMV начинаются со связывания 5'-конца кэпированной вРНК с мембраной ЭПР и рибосомами. Показано, что РНК TMV образует заякоренные на ЭПР гранулы при участии метилгуанозина кэпа (Christensen et al., 2009). Далее, как предполагается, с вРНК связываются новосинтезированные белки 183К и 126К, которые оказываются прочно ассоциированы с ЭПР при помощи клеточных белков. Показано, что белок 126К способен связываться с ЭПР в отсутствие других вирусных белков благодаря взаимодействию с мембраной амфипатической спирали, которая имеется в его структуре, но первичная ассоциация с ЭПР является весьма слабой, а для ее усиления и стабилизации требуются клеточные ассоциированные с мембраной белки *Tobamovirus multiplication 1*

(TOM1), Tobamovirus multiplication 2A (TOM2A) и малый ГТФ-связывающий белок (ADF-ribosylation like, ARL8). Надо отметить, что в клетках, инфицированных тобамовирусом, репликативные белки существуют как в связанной с мембранами, так и в растворимой форме, которая играет роль в супрессии РНК-сайленсинга (Hagiwara et al., 2003; Ibrahim et al., 2025). В образующиеся ВРК, содержащие вРНК и репликативные белки, также привлекается ТБ. ТБ TMV периферически ассоциируется с цитоплазматической поверхностью ЭПР через два гидрофобных участка, не являющимися TMD, и способствует образованию агрегатов ЭПР и формированию ВРК (Peiró et al., 2014). И хотя на всех стадиях инфекции ТБ TMV колокализуеться с репликативными белками в ВРК, их прямое взаимодействие не показано. Предполагается, что ТБ TMV способен привлекаться в ВРК, благодаря его способности связывать вРНК, с которой также связаны репликативные белки (Ashby et al., 2006; Ferralli et al., 2006; Sambade et al., 2008).

Во время инфекции TMV наблюдается образование двух типов ВРК – малые мобильные и более крупные, заякоренные на ЭПР. Было отмечено, что подвижные ВРК, образующиеся на ранних стадиях инфекции, содержат значительно большее количество ТБ, чем крупные заякоренные ВРК, образующиеся на поздних стадиях инфекции, в которых наблюдаются преимущественно репликативные белки и БО, и лишь небольшое количество ТБ (Asurmendi et al., 2004). Небольшие мобильные ВРК способны двигаться вдоль микротрубочек и кортикальной сети ЭПР-актин по направлению к ПД. Было показано, что ТБ TMV взаимодействует с МТ, однако данные о необходимости МТ для внутри и межклеточного транспорта разнятся. Поэтому было высказано предположение, что взаимодействие ТБ с МТ важно для нацеливания ВРК на сайты ЭПР, представляющие собой контакты ЭПР-ПМ-МТ, а транспорт к ПД от этих мест происходит по кортикальной актиновой сети (Heinlein, 2015; Huang, Heinlein, 2022; Pitzalis, Heinlein, 2017). За направленный транспорт ТБ (и содержащих ТБ мобильных ВРК) к ПД, вероятно, отвечает область в его N-концевом районе, которая принимает участие во взаимодействии с белком МК SYTA (Yuan et al., 2016). Также возможно, что благодаря этому взаимодействию ТБ TMV обладает способностью увеличивать ППС ПД (Levy et al., 2015; Pitzalis, Heinlein, 2017). Кроме того ТБ TMV может активировать β -1,3-глюканазу, разрушающую каллозу у входа в ПД и блокировать РТI-сигналинг, который возникает в ответ на вирусную инфекцию и приводит, среди прочего, к отложению каллозы (Epel, 2009; Huang et al.,

2023). Форма, в которой осуществляется межклеточный транспорт – остается спорным вопросом. БО не является необходимым для этого процесса, соответственно транспорт происходит либо в форме ВРНП, либо в форме ВРК (Ibrahim et al., 2025).

3.1.3. Вирус мозаики костра

Вирус мозаики костра (Brome mosaic virus, BMV) - представитель рода Bromovirus, семейства Bromoviridae. Репликативные белки 1a и 2a BMV имеют сходство аминокислотной последовательности с белками 126K и 183K TMV, соответственно, а репликация BMV тоже связана с мембраной ЭПР (Ishibashi, Ishikawa, 2016). ВРК BMV представляют собой сферулы около 60 нм, образованные инвагинациями мембраны в просвет ЭПР, причем внутреннее пространство таких сферул соединено с цитоплазмой тонкой шейкой (Рис. 1А) (Bamunusinghe et al., 2011). Интересно, что образование сферул и репликация BMV может эффективно происходить также в клетках дрожжей, и многие исследования, направленные на изучение биогенеза ВРК BMV и участвующих в этом процессе вирусных и клеточных белков, были проведены на этом объекте.

Вспомогательный репликативный белок 1a играет первостепенную роль в образовании ВРК, так как именно он индуцирует инвагинацию мембраны в просвет ЭПР, формируя сферулы, и привлекает в них ВРНК благодаря взаимодействию с цис-элементом, присутствующим в вирусных геномных РНК, а также привлекает в образующиеся сферулы необходимые клеточные и вирусные белки (Boon den et al., 2001; Liu et al., 2009; Schwartz et al., 2002). Белок 1a не имеет TMD, но содержит две амфипатические α -спирали А и В, находящиеся на расстоянии нескольких аминокислот друг от друга. Спираль А имеет решающее значение для ассоциации с мембранами и образования инвагинаций, в то время как спираль В обеспечивает взаимодействие с перинуклеарной мембраной ЭПР (Liu et al., 2009; Sathanantham et al., 2022). Для индукции образования инвагинаций важна способность белка 1a к самовзаимодействию, благодаря чему множество мономеров белка выстилают мембрану ЭПР и обеспечивают инвагинацию в просвет, образуя сферулу (Рис. 1А) (Diaz et al., 2012a). 1a привлекает в образуемые сферулы репликативный белок 2a, который важен для определения морфологии будущего ВРК. Показано, что для образования ВРК правильной формы белка 1a в сферулах должно быть примерно в 20 раз больше, чем белка 2a, а при нарушениях этого соотношений изменяется морфология ВРК (Bamunusinghe et al., 2011; Schwartz et

al., 2004). Так, при избыточной экспрессии белка 2a вместо сферул образуются многослойные стопки сжатых двумембранных слоев, которые, однако, сохраняют способность поддерживать репликацию так же эффективно, как сферулы (Schwartz et al., 2004).

Белок 1a привлекает к образующимся сферам необходимые клеточные факторы, участвующие в модификации мембран. В частности, необходимы белки ESCRT системы, которые индуцируют изгиб мембраны и способствуют образованию шейки, соединяющей сферулу с цитоплазмой. Белок 1a рекрутирует белки ESCRT, посредством прямого взаимодействия с SNF7, который, вероятно, привлекает другие компоненты, такие как VPS2 и VPS24. Делеция SNF7 прекращает образование сферул и почти полностью ингибирует репликацию BMV (Diaz et al., 2015). В образовании сферул важную роль играют также ретикулоны, которые белок 1a привлекает внутрь сферул, как предполагается, для стабилизации шейки (Diaz et al., 2010; Diaz et al., 2012b). Делеция гена одного из трех ретикулон-подобных белков дрожжей приводит к образованию сферул меньшего размера и ингибирует репликацию BMV, в то время как удаление всех трех генов приводит к невозможности образования сферул и почти полностью блокирует репликацию BMV (Diaz et al., 2010; Diaz et al., 2012b). Кроме того, среди клеточных факторов, регулирующих образование сферул, обнаружен компонент COPII-транспортного пути. Делеция гена белка Erv14, участвующего в формировании и сортировке грузов COPII-везикул, приводит к уменьшению количества сферул и значительному увеличению их размера, что может говорить об участии Erv14 в накоплении белка 1a, которое способствует самовзаимодействию, необходимому для ремоделирования мембраны и стабилизации сферул (Li et al., 2016).

Как уже упоминалось, большинство исследований, посвященных изучению ВРК BMV были сделаны на клетках дрожжей, что позволило детально изучить механизмы образования сферул и участвующие в этом процессе клеточные факторы. Несмотря на то, что ВРК, образуемые BMV в растениях и дрожжах на первый взгляд похожи, оказалось, что реорганизация мембран в растительных клетках, зараженных BMV, несколько отличается от наблюдаемой в дрожжах. Так, Vamunusinghe с соавторами, используя в качестве хозяина растения *N. benthamiana*, обнаружил три типа полиморфных везикул, которые образует BMV из мембран ЭПР. Везикулы типа 1 имели диаметр около 60 нм и по морфологии представляли собой сферулы, которые остаются соединенными с ЭПР

через шейки, таким образом, этот тип структур максимально похож на описанные в дрожжах ВРК BMV. Везикулы 2 типа имели большой диаметр (около 360 нм) и их образование из мембран ЭПР, могло быть индуцировано одним только БО, при этом в них не обнаруживалось электронно-плотного содержимого. Везикулы типа 3, судя по морфологии, образовывались путем слияния везикул типа 1 и типа 2. Уже на второй день после инфильтрации (дпи) в растениях обнаруживались все три типа везикул, собранные в большие группы, которые исследователи называют везикулярными карманами (Рис. 1А). Примечательно, что везикулярные карманы на ранних стадиях инфекции проявляли склонность к накоплению у клеточной стенки вблизи ПД (Vamunusinghe et al., 2011). В следующем исследовании было показано, что индуцированные БО везикулы образуются только в восприимчивых хозяевах и только теми БО, которые способны к инкапсидации, но не дефектными по этой функции, однако роль подобных БО-индуцированных везикул так и осталась не ясна (Vamunusinghe et al., 2013).

ТБ BMV, называемый 3а, тоже рекрутируется в ВРК и колокализуется с репликативными белками, и, как было сказано выше, скопления сферул BMV обнаруживаются на периферии клеток у ПД (Vamunusinghe et al., 2011; Dohi et al., 2001). Показано, что белок 3а BMV способен комплементировать транспорт тобамо- и потекс-вирусных РНК, и, соответственно, обладает всеми необходимыми активностями для выполнения функций ТБ (Tamaï et al., 2003). Он способен сиквенс-неспецифическим образом связывать РНК, а также способен локализоваться в ПД, по-видимому, через взаимодействие с клеточным белком NbNACa1, так как мутации в гене NbNACa1 ограничивали как локализацию 3а в ПД, так и межклеточный транспорт BMV (Kaido et al., 2007). Ранее сообщалось, что ТБ BMV может образовывать тубулы в протопластах, однако, они никогда не обнаруживались при инфекции в растениях (Lent van, Schmitt-Keichinger, 2006).

БО BMV участвует в регуляции репликации, но не всегда нужен для межклеточного транспорта. Так, штамм BMV M1 транспортируется межклеточно только в форме инкапсидированных вирионов, в то время как подобная зависимость не обнаруживается у других штаммов BMV (Okinaka et al., 2001; Schmitz, Rao, 1996; Takeda et al., 2005). Более того, точечные мутации в 3а могут принципиально менять необходимость в БО для межклеточного транспорта (Nagano et al., 2001; Sasaki et al., 2005). Предполагается, что С-конец 3а BMV участвует во взаимодействии с БО, и, вероятно, это взаимодействие

важно для дальнего транспорта, для которого необходимы оба белка (Vamunusinghe et al., 2011). Дальнейшие исследования требуются, чтобы изучить механизм межклеточного транспорта BMV и факторы, его обеспечивающие.

3.1.4. Вирус черного ожога свеклы

Вирус черного ожога свеклы (Beet black scorch virus, BBSV) - представитель рода *Betanecrovirus*, семейства *Tombusviridae*. BBSV кодирует два репликативных белка - вспомогательный репликативный белок p23 и репликазу p82, которая синтезируется в результате «проскока» рибосомой терминирующего кодона p23 и содержит полимеразный домен. Оба белка ассоциированы с ЭПР и необходимы для образования ВРК (Cao et al., 2015; Yuan et al., 2006). Показано, что в клетках, зараженных BBSV, обнаруживаются карманы из мембран ЭПР со множеством везикул внутри, которые соединены шейками с цитоплазмой (Рис. 1F). Интересно, что такие карманы с везикулами тоже могут быть связаны друг с другом посредством тубулярной структуры (Cao et al., 2015). Количество сферул внутри карманов может варьировать, а их диаметр составляет порядка 50-70 нм. В сферулах детектируется дцРНК, что говорит о том, что они являются сайтами репликации BBSV (Cao et al., 2015). Сферулы, образуемые при инфекции BBSV, выстланы внутри белком p23, который, предположительно является интегральным мембранным белком. p23, несомненно, играет роль в модификации мембран ЭПР, так как при временной экспрессии p23 способен вызывать агрегацию и образование карманов ЭПР (Cao et al., 2015). Однако, экспрессии одного только p23 недостаточно для формирования выраженных сферул, подобно тем, что наблюдаются при инфекции BBSV (Cao et al., 2015).

BBSV активно рекрутирует клеточные белки для образования ВРК. Так, p23 взаимодействует с белком теплового шока (Heat shock 70 kDa protein cognate 2, Hsc70-2), который, как было показано, необходим для репликации BBSV и, предположительно, сужает трубочки ЭПР, способствуя сборке ВРК или стабилизируя шейки сферул (Wang et al., 2018). Клеточный ретикулон RTNLB2 рекрутируется к ВРК белком p23 и способствует образованию сферул, возможно, подобно тому, как это описано для BMV (Zhang et al., 2023). Кроме того, при изучении взаимодействий белка p23 методом мечения с помощью turbo-ID белков, локализующихся в непосредственной близости к p23, были обнаружены компоненты ESCRT системы и несколько факторов, связанных с

секреторными путями, такие как белки SNARE, факторы АДФ-рибозилирования и белок Rab11a. Также в р23-индуцированных компартментах BBSV были обнаружены субъединицы миозиновых комплексов (Zhang et al., 2023; Zhang et al., 2025)

В инфицированных клетках ВРК BBSV часто обнаруживаются расположенными вблизи клеточных стенок и, возможно, ПД (Cao et al., 2015). Для транспорта BBSV необходимы три небольших белка р7а, р7b и р5', а БО необходим для системного заражения, но не является необходимым для межклеточного транспорта (Yuan et al., 2006). При временной экспрессии ТБ или БО никаких изменений в морфологии мембран клетки не наблюдается (Yuan et al., 2006; Zhang et al., 2011). ТБ Р7а при этом накапливается в ядрышке и тельцах Кахаля, где взаимодействует с фибрилларинном, причем это взаимодействие важно для репликации (Wang et al., 2012). Транспортные белки Р7b и Р5' локализуются в основном в цитоплазме и в небольшом количестве в клеточной стенке. Однако данных о субклеточной локализации транспортных белков в контексте вирусной инфекции и, соответственно, о их локализации в ВРК найти не удалось.

3.1.5. Вирус мозаики турнепса

Вирус мозаики турнепса (Turnip mosaic virus, TuMV) – представитель рода *Potyvirus*, семейства *Potyviridae*. Образование ВРК TuMV из мембран ЭПР индуцируется небольшим белком бк2, который содержит один ТМД и котрансляционно интегрирован в мембрану ЭПР. Показано, что при временной экспрессии бк2 способен индуцировать реорганизацию мембран с образованием везикул, аналогичных тем, что наблюдаются при вирусной инфекции, даже в отсутствие других вирусных белков (Wei, Wang, 2008). Способность бк2 к самовзаимодействию, которая обеспечивается α -спиралью в его С-концевом районе, важна для образования мембранных везикул, которое, вероятно, происходит благодаря олигомеризации бк2 внутри мембраны ЭПР, как это показано для многих вирусных белков, участвующих в ремоделировании мембран (Morozov, Solovyev, 2020). В состав ВРК помимо белка бк2 и репликазы, входят также белки С1, бк1, N1a, NS-Pro, Vpg, Р3, Р3N-PIPO и БО (Morozov, Solovyev, 2020). По мере развития инфекции TuMV, вирус реорганизует мембраны ЭПР с образованием структур двух типов: подвижных ВРК, транспорт которых происходит актин-зависимым образом, накапливающихся на периферии клетки у ПД, и крупного перинуклеарного тела,

включающего также микротрубочки, рибосомы и многие белки хозяина (Grangeon et al., 2013). По мере развития инфекции ВРК могут сливаться с мембранами хлоропластов, где тоже обнаружена активная репликация вируса (Wei et al., 2010).

Реорганизация мембраны в инфицированной TuMV клетке начинается с образования изгибающихся и свертывающихся мембран ЭПР (Convolutional membranes, CM), которые, как предполагается, являются местом процессинга вирусных полипротеинов и не являются сайтами репликации. Затем среди этих изогнутых мембран образуются одномембранные везикуло-подобные частицы, содержащие бк2, репликазу и дцРНК и представляющие собой ВРК TuMV (Wan et al., 2015). На основании данных, получаемых методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), долгое время считалось, что ВРК представляют собой везикулы (Grangeon et al., 2013). Однако результаты, полученные группой Wan с помощью 3D-реконструкции данных томографии, позволили выяснить, что эти образования (или, вероятнее, часть из них) представляют собой тубулообразные структуры (Рис. 1G). Стоит отметить, что аналогичная неожиданность ранее была обнаружена при 3D-реконструкции ВРК полиовируса животных, которые ранее на основании данных ТЭМ считались везикулярными (Wan et al., 2015). В местах образования CM уже в первый день инфекции образуются индуцированные белком бк2 одномембранные везикулы и/или трубочки, являющиеся местами репликации TuMV. Предполагается важная роль в этом процессе растительного белка RHD3, регулирующего в клетке слияние трубочек ЭПР. Было показано, что бк2 привлекает RHD3 в ВРК, а инфекция в растениях, нокаутных по RHD3, приводит к нарушению межклеточного транспорта и сильной задержке инфекции. Авторы высказывают предположение, что данный эффект может быть связан с задержкой созревания ВРК, для которого в норме необходим RHD3, а также говорить о возможной роли RHD3 в транспорте ВРК (Movahed et al., 2019). Предполагается, что отсоединение мембранных компартментов от ЭПР, опосредованное белком бк2, происходит COPII-зависимым образом в ERES, где обнаружена совместная локализация бк2 с белками Sec23 и Sec24 (Wei, Wang, 2008). Кроме того, в репликации и образовании везикул TuMV важную роль играют белки DRP1 и DRP2, которые участвуют в образовании везикул, покрытых клатрином. DRP1 and DRP2 взаимодействуют в составе ВРК с белками бк2, VPg, and CI, необходимыми для репликации TuMV и усиливают ее (Wu et al., 2018).

Транспорт ВРК TuMV к ПД обеспечивается скоординированным взаимодействием транспортных белков С1 и Р3N-Р1РО с 6k2-образованными везикулами. При этом белок Р3N-Р1РО отвечает за направленный транспорт в ПД, который зависит от малой ГТФазы RabE1d, участвующей в транспорте из компартментов пост-Гольджи к ПМ (Movahed et al., 2017a). Р3N-Р1РО способен изменять внутреннюю структуру ПД, увеличивать их ППС, а также способен транспортироваться в соседние клетки, причем этим его функциям способствует клеточный белок МК SYTA (Movahed et al., 2017b; Uchiyama et al., 2014). Показано, что Р3N-Р1РО рекрутирует клеточный Ca^{2+} -связывающий белок PCaP1 в ПД, где PCaP1 осуществляет Ca^{2+} -зависимую разборку актиновых филаментов, что позволяет увеличить ППС ПД либо за счет воздействия на локальное отложение каллозы, либо за счет разрушения актиновых филаментов непосредственно в каналах ПД (Cheng et al., 2020).

Белок С1 относится к семейству репликативных РНК-хеликаз SFII и необходим как для репликации, так и для транспорта вируса. В клетках, инфицированных TuMV, белок С1 образует цитоплазматические включения в виде вертушек или конусов, которые расположены на входе в ПД и пересекает клеточную стенку по каналам ПД. Его привлечение к ПД определяется взаимодействием с Р3N-Р1РО, а С1, в свою очередь, привлекает 6k2-содержащие ВРК к С1-содержащим структурам вблизи ПД благодаря взаимодействию С1 с 6k2 (Movahed et al., 2017a).

Интересно, что мутации консервативных остатков в TMD 6k2 нарушают транспорт ВРК и перенаправляют их в структуры АГ, что блокирует репликацию и транспорт вируса. Это подчеркивает тот факт, что ВРК для транспорта к ПД могут использовать нетрадиционные пути, проходящие в обход АГ (Cabanillas et al., 2018; Solovyev et al., 2022). Эти пути, по всей видимости, включают мембранные компартменты пост-Гольджи – MVB и вакуоль (Cabanillas et al., 2018; Jovanović et al., 2023; Wu et al., 2022). Так, показано, что 6k2 колокализуется и соочищается с белком Vti11, компонентом SNARE, локализуемым в TGN и MVB (Cabanillas et al., 2018). Также продемонстрировано, что нацеливание ВРК на MVB важно для развития инфекции и зависит от специфического взаимодействия белка 6k2 с белком ESCRT VSR4, а точечная мутация в VSR4 приводит к устойчивости растений к инфекции потивируса (Wu et al., 2022).

На поздних стадиях инфекции одномембранные везикулы TuMV созревают в более крупные двумембранные везикулы и/или трубочки с электронно-плотным содержимым

(Wan et al., 2015). Механизм их возникновения, вероятно, связан с оборачиванием мембраной ЭПР уже существующих одномембранных везикул/трубочек. Предполагается, что эти двумембранные структуры могут лежать в основе крупных перинуклеарных структур, наблюдающихся при конфокальной микроскопии на поздних стадиях инфекции (Grangeon et al., 2012). На поздних стадиях инфекции происходит активная сборка вирионов вблизи таких телец. По мере накопления, вирионы выстилают тонопласт и проникают внутрь вакуоли, заворачиваясь в мембрану тонопласта. Такая локализация вирионов, предположительно, может способствовать передаче тлями (Wak et al., 2017).

Несмотря на обширные исследования морфологии и внутриклеточного транспорта ВРК TuMV, вопрос о том, в какой именно форме происходит межклеточный транспорт, до сих пор остается нерешенной загадкой, и на настоящий момент существует три модели транспорта TuMV. Первая модель основывается на том, что в инфицированных TuMV клетках был показан транспорт бк2 везикул не только по направлению к ПД, но и через них, что демонстрирует способность TuMV транспортироваться межклеточно в форме ВРК (Movahed et al., 2019). Вторая модель предполагает возможность межклеточного транспорта TuMV в неканонической форме внеклеточных везикул. Movahed с коллегами в своем исследовании показали возможность слияния MVB, содержащих в ILV компоненты TuMV с ПМ, и продемонстрировали присутствие везикул, содержащих двуцепочечную РНК, во внеклеточном пространстве зараженных растений. Присутствие белков TuMV во внеклеточном пространстве также было подтверждено. Авторы также считают важным тот факт, что SNARE-белок Vti11, который играет существенную роль в инфекции TuMV, также обнаружен в протеоме внеклеточных везикул (Rutter, Innes, 2017). На основании этих данных авторы выдвигают предположение о том, что везикулы бк2 могут проникать во внеклеточное пространство путём слияния MVB с TuMV с ПМ и, возможно, таким образом перемещаться между клетками. Однако учитывая, что подобный способ транспорта ранее не был описан для вирусов растений, данный факт требует тщательных дальнейших исследований (Movahed et al., 2019). Третья модель предполагает возможность межклеточного транспорта в виде вирионов или вирион-подобных ВРНП, образованных БО и ВРНК (Movahed et al., 2019; Xue et al., 2023). Хотя образование интактных вирионов, по-видимому, все же не требуется для межклеточного распространения TuMV, поскольку делеции в N-концевой части БО, вызывающие

образование aberrантных длинных форм вирионов, не снижают эффективность межклеточного транспорта (Dai et al., 2020).

3.2. Вирус-индуцированное ремоделирование мембран митохондрий

Вирус некротической пятнистости дыни (Melon necrotic spot virus, MNSV), представитель рода *Gammaarmovirus*, семейства *Tombusviridae*, образует ВРК из мембран митохондрий. Репликативный аппарат MNSV включает малый вспомогательный белок p29 и получающийся в результате проскока его стоп-кодона большой репликативный белок p89, содержащий полимеразный домен (Genovés et al., 2006). Вспомогательный белок p29 является интегральным мембранным белком, имеющим три TMD. Центральный TMD p29 содержит последовательности, определяющие взаимодействие с митохондриальными мембранами, встраивание в которые приводит к обширной реорганизации структуры этой органеллы (Рис. 1Е) (Mochizuki et al., 2009). В клетках, инфицированных MNSV, структура митохондрий драматически изменяется: внутри образуются многочисленные крупные расширения, окруженные двойными мембранами, которые могут быть связаны между собой (Рис. 1Е). Одномембранные сферулы диаметром 45–50 нм образуются по периметру этих крупных расширений, а также по периферии реорганизованных митохондрий. Внутреннее содержимое сферул через шейку связано либо с цитоплазмой, если сферулы располагаются на периферии митохондрий, либо с просветом расширений, если сферулы располагаются вокруг таких расширений (Рис. 1Е) (Gomez-Aix et al., 2015). Крупные расширения также могут иметь поры, обращенные к цитоплазме, которые, предположительно, отвечают за обмен факторами, необходимыми для репликации вируса. Ремоделированные митохондрии представляют собой места репликации MNSV, поскольку в них детектируется вирусная дцРНК. Реорганизованные митохондрии достигают больших размеров (2 на 3,5 мкм), а расширения внутри них могут занимать до 80% общей площади органеллы. Также в них может обнаруживаться БО. Похожие на вирионы частицы могут располагаться либо внутри органеллы, либо вокруг нее, а также могут образовывать агрегаты в цитоплазме (Gomez-Aix et al., 2015). Примечательно, что подобные реорганизованные органеллы почти всегда обнаруживались в ассоциации с липидными каплями и ЭПР, в том числе вблизи ПД, а также зачастую образовывали кластеры (Gomez-Aix et al., 2015).

Геном MNSV кодирует два небольших транспортных белка p7A и p7B. Белок p7A может связывать РНК и локализуется в цитоплазматических гранулах, которые направляются актин-зависимым образом к ПД и закрепляются у них (Genovés et al., 2006; Navarro et al., 2019). Белок p7B - интегральный мембранный белок, котрансляционно встраивающийся в мембраны ЭПР. p7B, также как p7A, направленно транспортируется к ПД, но по независимому от p7A пути. Сначала СОРП-зависимым образом он направляется из ЭПР в аппарат Гольджи, а затем, транспортируется к ПД по неизвестному пост-Гольджи пути, или же он может достигать ПД путем латеральной диффузии вдоль ЭПР (Martínez-Gil et al., 2007; Navarro, Pallás, 2017; Serra-Soriano et al., 2017). Хотя конкретная роль p7B в транспорте вирусов пока неизвестна, была предложена модель, в которой его цитозольные участки взаимодействуют с p7A, связанным, в свою очередь, с вирусной РНК и этот комплекс может перемещаться от мест репликации к ПД через ЭПР, посредством транспорта, направляемого p7B (Navarro et al., 2006; Vilar et al., 2005). В качестве альтернативного пути, учитывая способность обоих транспортных белков транспортироваться к ПД двумя независимыми друг от друга механизмами, не исключена возможность того, что взаимодействие между двумя ТБ и вирусным геномом происходит уже на периферии клетки у ПД, а тот факт, что реорганизованные митохондрии, представляющие собой места репликации MNSV, часто обнаруживаются в ассоциации с ЭПР вблизи ПД, в целом согласуется с данной моделью (Gomez-Aix et al., 2015; Serra-Soriano et al., 2017).

3.3. Вирус-индуцированное ремоделирование мембран вакуолей

Вирус мозаики огурца (Cucumber mosaic virus, CMV), представитель рода *Cuscutovirus* семейства *Bromoviridae*, образует ВРК на тонопласте. Репликативный аппарат CMV, подобно родственному BMV, предоставлен двумя белками – вспомогательным репликативным белком 1a, который имеет сходство с 1a BMV, и, собственно, репликазой 2a (Hayes, Buck, 1990). ВРК, образуемые этими родственными вирусами очень похожи морфологически, но в отличие от BMV, репликация CMV происходит на мембране тонопласта и MVB. Так, при инфекции CMV происходит инвагинация мембраны тонопласта и MVB с образованием многочисленных одномембранных сферул диаметром 50–70 нм, имеющих шейку (Рис. 1D) (Wang et al., 2021b). Интересно, что при временной экспрессии белок 1a CMV локализуется только в

тонопласте, в то время как белок 2а наблюдается в нескольких субклеточных компартментах, включая тонопласт, MVB и ядро (Kim et al., 2006; Suzuki et al., 2003; Wang et al., 2021b; Watt et al., 2020). Кроме того, в цитоплазме обнаруживаются скопления икосаэдрических частиц, которые окружены мембраноподобными структурами (Wang et al., 2021b).

В отличие от BMV, экспрессии белка 1а которого достаточно для образования сферул (Schwartz et al., 2002), в случае CMV экспрессия и белка 1а, и белка 2а по отдельности приводит к образованию сферулоподобных структур, аналогичных тем, которые наблюдаются в клетках, инфицированных CMV. При коэкспрессии белков 1а и 2а морфология везикул максимально схожа с морфологией сферических образований в клетках листьев, инфицированных CMV (Wang et al., 2021b). С помощью иммунозолотого мечения было показано наличие (-)РНК CMV в сферических образованиях на периферии тонопласта, что свидетельствует о том, что эти сферулы являются сайтами репликации CMV (Cillo et al., 2002; Wang et al., 2021b). Было показано, что два интегральных мембранных белка тонопласта (Tonoplast intrinsic proteins, TIP) *A. thaliana*, TIP1 и TIP2, взаимодействуют *in vitro* и колокализуются в протопластах с вспомогательным репликативным белком 1а, но не взаимодействует при этом с репликазой 2а. Поэтому считается, что они могут играть роль в заякоривании белка 1а (Kim et al., 2006). С комплексом вирусной репликазы, образованной белками 1а и 2а на вакуолярных мембранах, напрямую взаимодействует клеточный белок Ts11-interacting protein (Tsip1), который, как было показано, участвует в регуляции репликации CMV (Nuh et al., 2011).

Белок 3а CMV отвечает за межклеточный транспорт и обладает всеми свойствами ТБ: локализуется в ПД и увеличивает ППС ПД, а также способен транспортироваться сам и направлять транспорт вирусной РНК из клетки в клетку. Кроме того, 3а способен комплекментировать транспорт изолята CMV, дефицитного по межклеточному транспорту (Jacquemond, 2012; Sasaki et al., 2005). Показано, что способность 3а увеличивать ППС ПД связана с расщеплением филаментов F-актина, которые, в свою очередь, контролируют работу и позиционирование каллозосинтазных комплексов (Su et al., 2012). Стоит отметить, что ТБ 3а способен, по крайней мере *in vitro*, взаимодействовать с белком CMV 2а, который взаимодействует с 1а (Hwang et al., 2005; Hwang et al., 2007). Не очень понятно, в какой момент вирусной инфекции это

взаимодействие происходит, но, вероятно, оно необходимо для привлечения 3а к ВРК, для связывания дочерних РНК и их последующего внутриклеточного транспорта от ВРК к ПД. Интересно, что при коэкспрессии 3а с RTNL3 в клетках табака, 3а может менять свою локализацию и локализоваться не в ПД, а в мелких структурах в ЭПР, и это снижает способность 3а увеличивать ППС ПД (Tilsner, Kriechbaumer, 2022).

3.4. Вирус-индуцированное ремоделирование мембран пероксисом

Вирус кустистой карликовости томата (Tomato bushy stunt virus, TBSV), представитель рода *Tombusvirus*, семейства *Tombusviridae*, способен реплицироваться как в растениях, так и в клетках дрожжей. В обоих случаях он отдает предпочтение мембранам пероксисом для образования своих ВРК, однако, по всей видимости, TBSV не имеет строгой потребности в определенном типе мембран, так как способен реплицироваться даже в мутантных линиях дрожжей, дефектных по пероксисомам, где в этом случае переключается на мембраны ЭПР (Jonczyk et al., 2007). Инфекция TBSV вызывает прогрессирующую реорганизацию мембран пероксисом, приводящую к образованию нескольких пероксисомальных мультивезикулярных телец (peroxisomal MVB, pMVB), представляющих собой мембраны пероксисом, окружающие часть цитозоля. В люмене pMVB располагается несколько сотен сферул диаметром 80–150 нм. Эти сферулы имеют шейки и представляют собой сайты репликации TBSV (Рис. 1С) (Castro de et al., 2017; Incarbone et al., 2020; McCartney et al., 2005). Примечательно, что pMVB обычно наблюдаются в тесной ассоциации с плотной сетью мембран ЭПР. Также интересно отметить, что длина вРНК, по-видимому, влияет на размеры образуемых сферул, действуя подобно линейке при биогенезе ВРК TBSV в клетках *N. benthamiana* (Kovalev et al., 2016).

Ключевую роль в образовании ВРК TBSV играет репликаза p92 и вспомогательный репликативный белок p33, соответствующий N-концевому домену p92, составляющие репликативный аппарат TBSV (Feng et al., 2022; Nagy, Feng, 2021). p33 представляет собой трансмембранный белок, отвечающий как за индукцию образования ВРК в мембранах пероксисом, а также за привлечение вРНК, белка p92 и хозяйских белков, необходимых для сборки ВРК. p33 выстилает образованные сферулы и способен к самовзаимодействию, поэтому предполагается, что он функционирует аналогично вспомогательному репликативному белку 1a BMV (Castro de et al., 2017; Nagy et al., 2025;

Nagy, Feng, 2021). Взаимодействие белка p33 с пероксисомами происходит в результате его связывания с клеточным белком PEX19, участвующим в биогенезе и транспорте пероксисом, однако в его отсутствие репликация может переключаться на мембрану ЭПР (Pathak et al., 2008; Sasvari et al., 2018). Для биогенеза ВРК и эффективной репликации CMV активно рекрутирует различные клеточные белки, участвующие в модификации мембран. Так, была показана важность участия локализованных в ЭПР белков комплекса SNARE. p33 взаимодействует с SNARE белками Ufe1 и Use1, которые входят в состав сайтов ERIS в ЭПР, где везикулы COP-I, поступающие из компартмента Гольджи, сливаются с ЭПР. Блокирование функции ERIS благодаря снижению уровней накопления белков Ufe1 и Use1, приводило к значительному снижению репликации TBSV, что говорит о необходимости этого компонента для биогенеза ВРК. Надо отметить, что ERIS играют роль в образовании пероксисомальной мембраны у дрожжей (Sasvari et al., 2018).

Подобно тому, как это описано для BMV, вспомогательный репликативный белок TBSV привлекает белки ESCRT, которые способствуют образованию сферул при инфекции CMV (Barajas et al., 2009). Экспрессия в растениях доминантно-негативных мутантов белков Vps23, Vps24, Snf7 и Vps4 сильно ингибирует репликацию TBSV. В клетках дрожжей было продемонстрировано взаимодействие белка p33 с Vps23 и BRO1 (вспомогательный фактор ESCRT), а также то, что в отсутствие этих факторов нарушается образование сферул и ингибируется репликация (Kovalev et al., 2016; Nagy, Feng, 2021).

Кроме того, TBSV, по-видимому, рекрутирует везикулы COPII в свои ВРК посредством взаимодействия p33 с ГТФазой Rab1. Это позволяет увеличить площадь мембранных поверхностей и создать оптимальный липидный состав внутри компартмента вирусной репликации (Inaba et al., 2019). Липидный состав в ВРК имеет важнейшую роль и регулируется различными путями. Например, белок p33 также рекрутирует малую ГТФазу Rab7 и изменение ее локализации приводит к изменению локализации множества ферментов липидного обмена хозяина, способствуя созданию оптимальной липидной среды в ВРК (Feng et al., 2021; Sasvari et al., 2020).

Для эффективного захвата клеточных факторов и привлечения их в состав ВРК, p33 контролирует работу клеточного белка-модулятора сборки актиновых филаментов Cof1, что приводит к стабилизации микрофиламентов и облегчению взаимодействия с необходимыми клеточными факторами (Nawaz-ul-Rehman et al., 2016). p33 TBSV

регулирует внутриклеточный транспорт стеролов, рекрутируя белки, связывающие оксистеролы (ORP), и взаимодействующий с ними белок VAP. Эти клеточные белки помогают TBSV стабилизировать участки МК между ЭПР и пероксисомой, тем самым облегчая эффективный транспорт стеролов из ЭПР к пероксисомальным мембранам, где образуется большое количество ВРК. Модуляция работы актиновых филаментов также может помогать стабилизировать взаимодействия в местах этих МК (Barajas et al., 2014; Nawaz-ul-Rehman et al., 2016).

На многих ТЭМ-фотографиях видно, что в зараженных TBSV клетках растений измененные вирусом пероксисомы очень часто обнаруживаются в плотной ассоциации с клеточной стенкой (McCartney et al., 2005). К сожалению, не представляется возможным предложить какую-либо модель внутриклеточного транспорта TBSV от ВРК к ПД, так как транспорт TBSV почти не изучен. Известно, что транспорт осуществляется ТБ, называемым p22, и эффективность транспорта увеличивается в присутствии супрессора сайленсинга p19. ТБ p22 является РНК-связывающим белком, ассоциированным с мембраной, локализуется в клеточной стенке, а его транспорт в ПД, предположительно, ответственен участок его N-концевого района (Desvoyes et al., 2002; Scholthof et al., 1995). Было показано, что транспорт TBSV ингибируется при обработке клеток латрункулином В, а значит, зависит от актиновых микрофиламентов (Harries et al., 2009). Однако более точные данные о механизмах транспорта ТБ TBSV или его взаимодействии с ВРК в настоящее время отсутствуют.

3.5. Вирус-индуцированное ремоделирование мембран хлоропластов

Вирус штриховатой мозаики ячменя (Barley stripe mosaic virus, BSMV), представитель рода *Hordeivirus*, семейства *Virgaviridae*, образует ВРК из мембран хлоропластов. Во время инфекции BSMV наблюдается сильное изменение морфологии и размеров хлоропластов. На их периферии из внутренней мембраны образуется множество небольших инвагинаций, каждая из которых содержит одну или несколько сферул внутри, соединенных шейками с цитоплазмой (Рис. 1Н). Сферулы образованы внешней мембраной хлоропластов, имеют диаметр порядка 50 нм и являются сайтами репликации, в которых обнаруживается дцРНК и репликативные белки (Jin et al., 2018; Lin, Langenberg, 1985; Torrance et al., 2006). Кроме того, по мере развития инфекции, инвагинация мембран хлоропластов постепенно прогрессирует, и внутри хлоропластов появляются крупные

цитоплазматические инвагинации, также содержащие сферулы, соединенные шейками с их внутренним содержимым (Рис. 1Н). Цитоплазматические инвагинации могут иметь двойную мембрану, а также содержать большое количество вирионов BSMV, что предполагает их роль в сборке вирионов на поздних стадиях инфекции (Jin et al., 2018).

Репликативный аппарат BSMV представлен репликативными белками α и полимеразой γ . Оба репликативных белка локализуются в хлоропластах и рекрутируют в хлоропласты белок γ b, РНК BSMV и различные клеточные факторы для ремоделирования мембран и создания ВРК (Zhang et al., 2017). На ранних стадиях инфекции BSMV белок γ b рекрутируется к внешней мембране хлоропластов путем связывания с α a, и это взаимодействие способствует репликации вируса, причем этот эффект связан не с функцией γ b как супрессора сайленсинга, а с тем, что γ b усиливает расплетание белком α a дуплексов вирусных дцРНК (Zhang et al., 2017). Кроме того, γ b BSMV взаимодействует с NADPH-зависимой тиоредоксинредуктазой С (NTRC), основным компонентом антиоксидантной системы хлоропластов и нарушает ее работу, создавая окисленную микросреду, благоприятную для репликации вируса (Wang et al., 2021a). Позже было показано, что γ b также выступает в роли фактора, переключающего процесс синтеза геномных РНК на их транспорт, и эта его функция зависит от пальмитоилирования. Так, непальмитоилированный γ b преимущественно ассоциирован с ВРК и усиливает репликацию, тогда как пальмитоилированный пальмиотил ацилтрансферазами (palmitoyl acyltransferase (PAT)) NbPAT15 и NbPAT21 белок γ b рекрутирует ТБ TGB1 к хлоропластам и способствует сборке ВРНК комплексов из TGB1 и ВРНК (Jiang et al., 2020; Yue et al., 2022; Zhang et al., 2017). На периферию хлоропластов также привлекаются образованные из мембран ЭПР мобильные везикулы, содержащие ТБ TGB2 и TGB3 (Jiang et al., 2025). Интересно отметить, что для привлечения TGB2 к хлоропластам требуется не только γ b, но и репликаза, что предполагает их возможное взаимодействие (Torrance et al., 2006). Далее комплекс РНК-TGB1- γ b связывается с везикулами, содержащими белки TGB2 и TGB3, благодаря взаимодействию TGB1 и TGB3. Показано, что для сборки стабильных комплексов TGB1 и РНК, а также их межклеточного транспорта необходима АТФазная активность TGB1, а γ b взаимодействует как с РНК, так и с TGB1, усиливая его АТФазную активность, а также способствует взаимодействию TGB1 с TGB3. Для образования транспортно-компетентного комплекса, по всей видимости, TGB1 также рекрутирует из ядра

фибрилларин (Li et al., 2018). Образованные комплексы транспортируются сначала в ЭПР, а затем направляются к ПД путем латеральной диффузии по ЭПР-актиновой сети. У ПД пальмитоилированный γ b (и, вероятно TGB2, но не TGB1 или TGB3) связывается с белками реморинами, что способствует увеличению ППС ПД и облегчает межклеточный транспорт вирусных геномов (Yue et al., 2022).

4. ВРК, как компартменты, связывающие процессы репликации и транспорта

Развитие инфекции вирусов растений зависит от эффективности репликации и скорости транспорта дочерних геномов в соседние клетки. Для некоторых вирусов растений описана способность сопрягать процессы транспорта и репликации непосредственно в составе ВРК (Laliberté, Zheng, 2014; Tilsner et al., 2013; Zhang et al., 2025). В этих случаях ВРК подвижны, и репликация, по всей видимости, может происходить непосредственно в процессе внутриклеточного транспорта к ПД, а также в образованных у ПД РАМВs, которые обеспечивают корепликационный транспорт вирусных геномов через ПД (Tilsner et al., 2013). Подобное сопряжение процессов репликации и транспорта кажется наиболее эффективной стратегией развития инфекции. У других вирусов, в основном тех, ВРК которых представляют собой сферулы, образованные инвагинациями мембран различных органелл, подвижность их репликационных компартментов не показана, что вероятно, связано с их морфологией, однако подобные вирус-индуцированные мембранные компартменты очень часто обнаруживаются именно на периферии клеток у ПД (Cao et al., 2015; He et al., 2023). При этом даже те вирусы, для чьих ВРК не показана подвижность, имеют тесную связь между процессами репликации и транспорта, что связано с необходимостью пространственной колокализации ТБ с новосинтезированными в ВРК вирусными геномами (Tilsner, Oparka, 2012). Межклеточный транспорт вирусов происходит на очень ранних стадиях жизненного цикла вируса, иногда уже через 4-8 часов от начала инфекции, когда ВРК еще не является преобладающей в клетке (Levy, Tilsner, 2020; Tilsner, Oparka, 2012). Учитывая, что ТБ связывают вирусные геномы сиквенс-неспецифическим образом, неопределенным остается ответ на вопрос о том, каким образом может обеспечиваться специфичность связывания ТБ с геномными РНК для их последующего транспорта (Waigmann et al., 2004; Lucas, 2006; Tilsner, Oparka, 2012). Так как, в отличие от ТБ, вирусные репликазы, преимущественно, связывают РНК специфически, взаимодействуя

с определенными вторичными структурами ВРНК, общепринятым является мнение, что специфичность транспорта обеспечивается привлечением ТБ к ВРК, которые ограничивают геномные РНК в вирус-индуцированном мембранном компартменте (Burnett et al., 2025; Rao et al., 2014; Tilsner, Oparka, 2012). Однако механизмы, посредством которых ТБ привлекаются в состав ВРК, по большей части остаются малоизученными.

По крайней мере у некоторых вирусов это взаимодействие может облегчаться прямым взаимодействием ТБ с репликативными белками, как это происходит в случае инфекции PVX, возможно, BSMV и, как предполагается, CMV и BMV (Bamunusinghe et al., 2011; Hwang et al., 2007; Torrance et al., 2006; Wu et al., 2019). Ассоциация ТБ с ВРК может происходить путем взаимодействия с репликазой не напрямую, а через белок-посредник. Показано, что привлечение ТБ RCNMV обеспечивается связыванием с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (GAPDH), которая также взаимодействует вспомогательным репликативным белком p27, а снижение экспрессии гена NbGAPDH-А ингибировало включение ТБ RCNMV в кортикальные ВРК, но не влияло на транспорт ТБ в ПД (Kaido et al., 2014). Также возможно, что у некоторых вирусов, синтез ТБ может происходить непосредственно в ВРК.

Однако, учитывая факт возможности комплементации дефектных по транспорту вирусов неродственными транспортными системами гетерологичных вирусов (в том числе при комплементации *in trans*, когда ТБ экспрессируются в клетке отдельно от вирусного генома), возникает вопрос о том, посредством каких взаимодействий происходит привлечение ТБ к ВРК в этом случае (Latham, Wilson, 2008; Levy, Tilsner, 2020). Одним из более вероятных механизмов может быть нацеливание ТБ на определенные общие клеточные факторы, которые используются для образования ВРК многими вирусами. Как описано выше, посредством различных механизмов вирусы вызывают обширную пролиферацию клеточных мембран для увеличения площади поверхности репликации, при этом могут образовываться одно- или двумембранные везикулы и/или трубочки, различные инвагинации и сферулы. Но клеточные факторы, вовлекаемые в эти процессы, часто являются общими для многих вирусов (Laliberté, Zheng, 2014). Так, для образования ВРК вирусы обычно рекрутируют клеточные белки, участвующих в модификации мембран, такие как RTNLs и RHD3, белки систем ESCRT и SNARE, а также различные белки раннего и позднего секреторного пути и компоненты

эндоцитозного пути (Agaoua et al., 2021; Laliberté, Zheng, 2014). Вирусы также активно манипулируют клеточными липидами и путями биосинтеза липидов при образовании ВРК. Для образования ВРК многих вирусов показана необходимость доставки специфических липидов, которая происходит, по крайней мере частично, посредством невезикулярного межмембранного обмена в местах МК (Barajas et al., 2014; Nagy et al., 2016).

Все эти клеточные компоненты, взаимодействующие с ВРК, потенциально, могут быть целями и для ТБ. Клеточные белки, описанные в литературе как взаимодействующие с ТБ (в частности, факторы трансляции, шапероны, белки цитоскелета и мембранных контактов), обычно рассматриваются с точки зрения участия в транспорте к ПД и взаимодействии с ПД, хотя на самом деле могут играть роль во взаимодействиях ТБ с ВРК, что, безусловно, требует тщательного изучения (Kumar, Dasgupta, 2021). Таким образом, изучение механизмов образования ВРК и идентификация общих клеточных факторов участвующих в этом процессе у многих вирусов, а также изучение возможности взаимодействия ТБ с этими клеточными факторами может пролить свет на механизмы межклеточного транспорта вирусов растений.

Так, клеточные белки, участвующие в формообразовании мембранных структур, например, ретикулоны рекрутируются многими вирусами для образования ВРК и также для этого класса белков идентифицированы взаимодействия с ТБ различных вирусов. Интересно, что ретикулоны играют важную роль в образования ВРК многих вирусов, как растений, так и животных, что говорит о консервативности такого механизма (Diaz, Ahlquist, 2012). Как отмечалось выше, в клетках дрожжей, дефектных по ретикулонам, репликация BMV почти полностью прекращалась, так как они необходимы для формирования шеек сферул (Diaz et al., 2010; Diaz, Wang, 2014). А при инфекции BBSV RTNLB2 привлекается белком р23 для модификации ЭПР и способствует эффективной репликации (Zhang et al., 2023). Для белка Р3 вируса мозаики сои, участвующего в репликации, было показано взаимодействие с ретикулоном GmPHD (Cui et al., 2018). Помимо этого, RTNLs играют роль в поддержании МК, которые могут использоваться вирусами для невезикулярного обмена липидами (Levy, Tilsner, 2020). Так как ПД являются особым типом МК, RTNLs также являются важными компонентами ПД, и, возможно, участвуют в регуляции ППС ПД способствуя сужения десмотрубочки (Knox et al., 2015; Kriechbaumer et al., 2015; Tilsner et al., 2011). Как показало множество

исследований, как сами RTNLs, так и белки, взаимодействующие с RTLNs, такие как реморины, SYT1 и RHD3, являются мишенями для разных вирусных ТБ (Borner et al., 2005; Feng et al., 2016; Kriechbaumer et al., 2015; Tilsner, Kriechbaumer, 2022; Uchiyama et al., 2014). Таким образом, RTNLs могут быть одними из вероятных кандидатов на роль клеточных факторов, способствующих связи процессов репликации и транспорта.

Конкретные механизмы внутриклеточного транспорта, посредством которых вирусные геномы транспортируются ТБ от ВРК к ПД, изучены, к сожалению, лишь для небольшого количества вирусов. Транспорт большинства вирусов растений осуществляется актин-зависимым путем, что кажется вполне закономерным, учитывая, что транспорт макромолекул и органелл в растительных клетках обеспечивается актиновым цитоскелетом (Laliberté, Zheng, 2014). Транспорт одних вирусов может требовать только интактной ЭПР-актиновой сети, но не зависеть от секреторного пути (TMV, PVX), другие же могут зависеть от раннего секреторного пути (MNSV, TuMV), позднего секреторного пути (TuMV) и, возможно, эндоцитоза (вирус метельчатости верхушки картофеля) (Agbeci et al., 2013; Genovés et al., 2010; Haupt et al., 2005; Wei, Wang, 2008). Однако, есть вирусы, (полулатентный вирус мятлика, вирус мозаики коровьего горошка) которые, по всей видимости, могут не зависеть от актомиозиновой сети или секреторного пути и транспортируются путем латеральной диффузии вдоль ЭПР (Pouwels et al., 2002; Schepetilnikov et al., 2008).

Таким образом, хотя разные вирусы, очевидно, используют различные механизмы образования ВРК и внутриклеточного транспорта, их общим свойством является тесная связь процессов репликации и транспорта, которая необходима для повышения специфичности и эффективности транспорта. Образование при участии ТБ ВРК в непосредственной близости к ПД на ранних стадиях инфекции, позволяет обеспечить высокую координацию этих процессов. Изучение структуры и принципов формирования таких ВРК, понимание роли ТБ белков в этом процессе, а также установление молекулярных механизмов и взаимодействий, обеспечивающих эффективный межклеточный транспорт, важно не только с точки зрения получения фундаментальных научных знаний о взаимодействии вирус-растение, но и может способствовать решению задач фитовирусологии, связанных с разработкой эффективных методов противовирусной защиты растений.

5. Транспортные белки, кодируемые бинарным блоком транспортных генов

Относительно недавно был идентифицирован и описан вирус зеленой пятнистости гибискуса (*hibiscus green spot virus*, HGSV; род *Higrevirus*, семейство *Kitaviridae*), содержащий транспортный модуль, эволюционно родственный TGB (Lazareva et al., 2017; Melzer et al., 2011). Белки, кодируемые транспортным модулем HGSV, стали объектом данного исследования. HGSV, впервые обнаруженный в растениях гибискуса *Hibiscus arnottianus*, поражает также цитрусовые растения, вызывая хлоротические пятна на листьях и на плодах (Pereira et al., 2025). HGSV имеет геном, состоящий из трех РНК положительной полярности. РНК1 кодирует репликазу, родственную таковой у представителей семейства *Virgaviridae*. РНК3 кодирует БО и два белка с неизвестной функцией, а РНК2 содержит четыре открытые рамки считывания (*open reading frame*, ORF). ORF1 РНК2 кодирует белок с неизвестной функцией, а ORF2, ORF3 и ORF4 кодируют модуль транспортных белков, эволюционно родственный TGB (Lazareva et al., 2017; Melzer et al., 2011). ORF2 кодирует хеликазу, имеющую сходство с TGB1-белками, однако, проявляющую большее сходство с репликативными хеликазами SF I рода *Benyvirus*. ORF3 кодирует TGB2-подобный белок, который является интегральным мембранным белком, содержит два TMD, и демонстрирует незначительное сходство с TGB2 по последовательности центральной гидрофильной области. Помимо ORF, кодирующих TGB1- и TGB2-подобные белки, в геноме HGSV также присутствует ORF4 в положении, соответствующем TGB3. Однако продукт ORF4 представляет собой очень короткий (47 аминокислотных остатков) белок, содержащий два длинных гидрофобных домена с чрезвычайно маленькой центральной гидрофильной областью, и не имеет сходства ни с одним белком TGB3 (Solovyev et al., 2012). Кроме того, в экспериментах по комплементации транспорта было показано, что только два TGB-подобных белка HGSV, кодируемые ORF2 и ORF3, необходимы для транспорта, в то время как продукт ORF4 не является необходимым для межклеточного транспорта, по крайней мере в *N. benthamiana*. Транспортный модуль, состоящий из ORF2 и ORF3 РНК2 HGSV, был назван «бинарным транспортным блоком», а кодируемые белки – BMB1 и BMB2 (Lazareva et al., 2017).

Транспортные модули, родственные BMB были также идентифицированы у X-вируса фисташки, а также среди вирус-подобных контигов (*virus like assembles*, VLA) в транскриптах *Lathyrus sativus*, *Litchi chinensis* и *Quercus castanea*. Стоит отметить, что

по крайней мере в VLA *L. sativus* и *L. chinensis* отсутствует ORF, в положении, соответствующем TGB3 (Morozov, Solovyev, 2015; Morozov, Solovyev, 2022; Solovyev, Morozov, 2017). Наличие транспортного генного модуля, состоящего из хеликазы и мембранного белка, схожего с TGB2, как в случае бинарного транспортного блока, по всей видимости, может быть достаточно для обеспечения межклеточного транспорта. Учитывая отдаленное родство белков TGB и BMB, есть основания полагать, что транспортный модуль BMB может олицетворять промежуточную стадию эволюции TGB, когда уже существовал генный блок TGB1-TGB2, а полноценно функционирующий белок TGB3 еще не сформировался. Согласно такому сценарию, на первом этапе возникли ген TGB1 (вероятно, вследствие дубликации домена репликативной РНК-хеликазы) и ген TGB2 (возможно, путем горизонтального переноса генов или вследствие сдвига рамки считывания С-концевого участка TGB1), после чего на втором этапе мог быть приобретен TGB3 (Morozov, Solovyev, 2012; Morozov, Solovyev, 2015). Данная модель предполагает, что TGB3 является скорее вспомогательным, нежели чем необходимым белком, и вероятно, эволюционное приобретение гена TGB3 могло закрепиться естественным отбором, поскольку повышало эффективность транспорта в определенных хозяевах или тканях растений (Morozov, Solovyev, 2015).

Белок BMB1 HGSV отдаленно связан с белками TGB1 по последовательности, и как предполагается по аналогии с TGB1, способен связывать РНК, хотя экспериментально это не изучалось. Косвенно это подтверждается в упомянутых выше экспериментах по комплементации транспорта, поскольку белок BMB1 является единственным вирусным белком в этой системе, потенциально способным формировать транспортные ВРНП (Lazareva et al., 2017). Белок BMB2 имеет два гидрофобных TMD, интегрированных в мембрану ЭПР, и при временной экспрессии формирует из мембран ЭПР РАМВs у ПД, которые, по аналогии с РАМВs, образуемыми при инфекции PVX, могут представлять собой ВРК. Внутриклеточный транспорт BMB2 к РАМВs, вероятно, осуществляется путем латеральной диффузии в мембранах, формирующих сеть ЭПР, так как не зависит от секреторного пути, проходящего через аппарат Гольджи, но требует целостности ЭПР-актиновой сети (Lazareva et al., 2017a). При временной экспрессии белок BMB1 локализуется в цитоплазме и нуклеоплазме, а коэкспрессия с белком BMB2 направляет BMB1 в РАМВs и далее по каналам ПД в соседние клетки (Lazareva et al., 2017). Поскольку транспортный модуль BMB не имеет аналога белка TGB3, BMB2, по всей

видимости, функционально эквивалентен комплексу TGB2 с TGB3. Белок BMB2, также как и TGB2 PVX обладает свойствами, характерными для ретикулонов (Lazareva et al., 2021b; Lazareva et al., 2021a). Функции ретикулонов определяются RHD доменом, который содержит два TMD и гидрофильную цитозольную петлю между ними, обладает W-образной топологией и образует клиновидные «шпильки», создающие кривизну липидного бислоя при олигомеризации (Kriechbaumer, Brandizzi, 2020). Белок BMB2 имеет сходную с ретикулонами молекулярную организацию и W-образную топологию в мембране, а временная экспрессия BMB2, приводящая к высоким уровням накопления белка, вызывает сужение трубочек ЭПР, аналогично тому, как это происходит при экспрессии ретикулонов (Lazareva et al., 2021a). Аналогичные свойства показаны для белка TGB2 PVX, что предполагает существование консервативного механизма ремоделирования мембран, присущего BMB2 HGSV и TGB2 PVX (Lazareva et al., 2021a). Такая особенность белков, вероятно, может отвечать за образование мембранных телец из мембран ЭПР, хотя структура таких телец и механизмы их образования до настоящего времени не были исследованы. Также возможно, что модификация трубочек ЭПР белками BMB2 и TGB2 может быть необходима для формирования исходных ВРК, которые далее развиваются в РАМВs или более крупные ВРК в перинуклеарной области при участии других клеточных и вирусных белков. Как упоминалось выше, образование ВРК многих вирусов требует привлечения ретикулонов, что говорит о консервативности использования подобного механизма модификации мембраны при образовании ВРК (Laliberté, Zheng, 2014).

Было показано, что BMB2 способен увеличивать ППС ПД, причем это его свойство коррелирует с его способностью вызывать сужения трубочек ЭПР. Кроме того, BMB2, как и TGB2 имеет сродство к мембранам с высокой степенью кривизны, что может объяснять их локализацию вблизи или внутри ПД, ведь десмотрубочка считается одной из самых изогнутых мембран в клетке (Lazareva et al., 2021a). Таким образом, BMB2 с одной стороны способен модифицировать ПД, а с другой – отвечает за образование ассоциированных с ПД мембранных компартментов, связанных, предположительно, с репликацией вируса, и сопрягать, таким образом, процесс репликации вируса с межклеточным транспортом. Учитывая сходство в активности белков, кодируемых TGB и BMB модулями, представляется вероятным, что эта модель может быть применима к более широкому спектру вирусов растений.

Детали механизмов, посредством которых ТБ ВМВ1 и ВМВ2 бинарного блока транспортных генов обеспечивают транспорт вируса, а также структура образуемых для этого процесса периферических мембранных телец, оставались неизученными до настоящего момента.

Материалы и методы

Реактивы

Стрептомицин, спектиномицин, рифампицин, канамицин и тетрациклин «CDH» (Индия); ацетосирингон «Sigma-Aldrich» (США); 2-(N-морфолино) этансульфоновая кислота (MES) «Thermo Fisher Scientific» (Бельгия); Кумасси бриллиантовый синий G-250 «Servicebio» (Китай); Ni-NTA агароза «Macherey-Nagel» (Германия); ЭДТА «VWR international LLC» (США); MgCl₂ «Хеликон» (Россия); NaCl «Хеликон» (Россия); дрожжевой экстракт «Bio Springer» (Франция); глицерин «AppliChem» (Германия); бромфеноловый синий «Sigma-Aldrich» (США); минеральное масло «ICN Biomedicals» (США); ДМСО «MP Biomedicals» (Франция); изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) «CHEM-IMPEX INTL» (США); калия ацетат «CDH» (Индия); ингибитор протеаз (Protease Inhibitor Cocktail) «Sigma-Aldrich» (Израиль); бромфеноловый синий «Sigma-Aldrich» (США); хлороформ «Мосреактив» (Россия); Нерес «Thermo Fisher Scientific» (Бельгия); глицин «VWR international LLC» (США); бромид этидия «AppliChem» (Германия); высокоочищенная вода Milli-Q «Millipore» (Франция); изопропанол «Химмед» (Россия); агароза «Lonza» (США); бактоагар «VWR international LLC» (США); дрожжевой экстракт «Хеликон» (Россия); бактотриптон «VWR international LLC» (США); трис «VWR international LLC» (США); акриламид «AppliChem» (Германия); тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) «Servicebio» (Китай); Понсо С «Servicebio» (Китай); персульфат аммония «Хеликон» (Россия); бисакриламид «Amresco» (США); мочевины «Sigma-Aldrich» (Германия); додецилсульфат натрия «AppliChem» (Германия); НЗВОЗ «Хеликон» (Россия); NaH₂PO₄·2H₂O «Хеликон» (Россия); CH₃COOK «Хеликон» (Россия); HCl «Химмед» (Россия); изопропанол «Химмед» (Россия); фенол «Acros Organics» (США); 2-меркаптоэтанол «Ferak Berlin» (Германия); цитрат свинца «Electron Microscopy Sciences» (США); сухое молоко (Blotting Grade) «Carl Roth» (Германия); Tween 20 «Хеликон» (Россия); PEG 8000 «Sigma-Aldrich» (США); гуанидингидрохлорид «AppliChem» (Германия); аммония ацетат «CDH» (Индия); PMSF «Thermo Fisher Scientific» (Бельгия); KCl «Хеликон» (Россия); сахароза «Acros Organics» (Бельгия); Осмий тетраоксид «Sigma-Aldrich» (США); DAB «Sisco Research Laboratories» (Индия); лептомицин В «Sigma-Aldrich» (США); этиленгликоль-бис(сукцинимидилсукцинат) «Merck» (Германия); глутаровый альдегид «CDH» (Индия); анилиновый синий

«Servicebio» (Китай); Натрия какодилат 3-водный «HiMedia Laboratories Pvt.» (Индия); смола эпоксидная Spi-ron 812 «SPI Supplies» (США); смола акриловая белая LR White «Sigma-Aldrich» (США); уранилацетат «TLC Pharmaceutical Standards» (Канада).

Ферменты и наборы

РНКаза А, ДНКаза I, T4-ДНК-лигаза, обратная транскриптаза RevertAid H Minus Reverse Transcriptase и эндонуклеазы рестрикции производства «Thermo Fisher Scientific» (США); эндонуклеазы рестрикции производства «Сибэнзим» (Россия); ДНК-полимераза Encyclo производства «Евроген» (Россия). В работе использовались набор для выделения ДНК из геля «DNA Extraction Kit» производства «Thermo Scientific» (США); реактив для выделения тотальной РНК из растений ExtractRNA «Евроген» (Россия); набор для выделения и очистки плазмид из культур клеток «Plasmid Miniprep 2.0» производства «Евроген» (Россия). Для количественной ПЦР использовали готовую смесь qPCRMix M-440 «Синтол» (Россия). Для проявки Вестерн-блотов использовали систему ECL «GE Healthcare Bio-Sciences» (США).

Для обнаружения белков использовали конъюгированные с пероксидазой кроличьи анти-GFP антитела «Rockland» (США); анти-кроличьи антитела, конъюгированные с 12 нм коллоидным золотом «Jackson ImmunoResearch» (Великобритания); поликлональные кроличьи анти-GFP и анти-tRFP антитела «Евроген» (Россия); анти-rabbit IgG вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой «Sigma-Aldrich» (США); BMB2-QTY «Almabion» (Россия).

Векторы для клонирования и бактериальные штаммы

Для получения конструкций для агротрансформации использовали высококопийный вектор pLN7000*, имеющий устойчивость к спектиномицину и стрептомицину, который обладает способностью реплицироваться и в *Escherichia coli* и в *Agrobacterium tumefaciens*. При клонировании использовали штамм *E. coli* XL-1Blue с устойчивостью к тетрациклину. А для дальнейшей работы с этими векторами применялся штамм *A. tumefaciens* C58C1, имеющий устойчивость к карбенициллину и рифампицину.

Для экспрессии белков соответствующие гены были клонированы в вектор pET-33b(+) (Novagen, USA) содержащий ген устойчивости к канамицину или экспрессионный вектор pQE-40 (Qiagen, Германия), содержащий ген устойчивости к ампициллину. Конструкции экспрессировали в *E. coli* в штаммах BL21(DE) или M(15).

Все бактериальные культуры, использованные в работе росли на твердой или жидкой бактериальной среде LB (NaCl 5 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, бактотриптон 10 г/л). Для приготовления твердой среды добавляли дополнительно 2 % агара.

Для экспрессии белка использовали жидкую среду 2YT (NaCl 5 г/л, дрожжевой экстракт 10 г/л, бактотриптон 16 г/л). Все среды стерилизовали путем автоклавирования.

Растительный материал

Растения *N. benthamiana* выращивали и содержали в теплице или в камерах для выращивания в стандартных условиях (16-часовой/8-часовой цикл свет/темнота, температура 24°C днем и 20°C ночью; влажность около 50%). Для экспериментов использовали 5–6-недельные растения.

Получение рекомбинантных конструкций

Рекомбинантные конструкции для временной экспрессии белков BMB1 и BMB2, а также их N- и C-концевых слияний с флуоресцентными белками, конструкции ER-mRFP, mRFP, mRFP-Fib2 и PVX-POL-GFP были описаны ранее (Gushchin et al., 2013; Lazareva et al., 2017a; Lazareva et al., 2017; Lazareva et al., 2021b). Для наработки дигидрофолат-редуктазы (DHFR) в клетках *E. coli* использовался экспрессионный вектор pQE-40 (Qiagen, Германия). Праймеры, используемые для создания остальных рекомбинантных конструкций перечислены в таблице 1.

Для получения конструкции pLN-GFP-BMB1d22 часть гена BMB1, кодирующая C-концевой фрагмент белка, не содержащий 22 C-концевых аминокислотных остатка, была амплифицирована с помощью праймеров BMB1C-BglII-P и BMB1C-d22-M. Полученный продукт был расщеплен эндонуклеазами рестрикции *BglII-XbaI* и клонирован по тем же сайтам в конструкцию pLN-GFP-BMB1 для замены соответствующей последовательности BMB1 дикого типа.

Для получения конструкции pLN-BMB1d22, конструкция pLN-GFP-BMB1d22 была обработана эндонуклеазой рестрикции *NcoI* для удаления кодирующей последовательности GFP, с последующим лигированием.

Для получения pLN-BMB1-BMB2 кодирующая последовательность mRFP в ранее описанной конструкции pLN-mRFP-BMB2 была удалена путем обработки эндонуклеазами рестрикции *XhoI-BamHI* и заменена кодирующей последовательностью BMB1, из конструкции pLN-BMB1, обработанной теми же эндонуклеазами.

Для создания рLH-GFP-BMB1-BMB2 конструкция рLH-GFP-BMB1 была расщеплена эндонуклеазами рестрикции *XhoI-BglII*, и полученный фрагмент был клонирован в аналогично обработанную конструкцию рLH-BMB1-BMB2.

Для получения рLH-BMB2-mN и рLH-BMB2-mN-mRFP кодирующие последовательности были амплифицированы на матрице ранее описанных конструкций рLH-BMB2 и рLH-BMB2-mRFP, соответственно, с использованием праймеров BMB2-mN-P и Right. Полученные ПЦР-продукты были обработаны эндонуклеазами рестрикции *XhoI-XbaI* и клонированы в аналогично расщепленный бинарный вектор рLH*.

Для получения рLH-BMB2-mHydr и рLH-BMB2-mHydr-mRFP кодирующие последовательности были амплифицированы на матрице ранее описанных рLH-BMB2 и рLH-BMB2-mRFP соответственно, с использованием праймеров BMB2-mHydr-P и Right. Полученные ПЦР-продукты были обработаны эндонуклеазами *XhoI-XbaI* и клонированы в аналогично расщепленный бинарный вектор рLH*.

ПЦР с частично перекрывающимися праймерами была использована для введения мутаций в центральную область белка BMB2. На первом этапе один ПЦР-продукт был получен с использованием ранее описанного рLH-BMB2 в качестве матрицы и праймеров Left и BMB2-mMid-ovl-M, а другой ПЦР-продукт был получен на матрице рLH-BMB2 или рLH-BMB2-mRFP с использованием праймеров Right и BMB2-mMid-ovl-P. На втором этапе два ПЦР-продукта были объединены путем амплификации с использованием праймеров Left и Right. Полученные фрагменты ДНК были расщеплены ферментами *XhoI-XbaI* и клонированы в аналогично расщепленный бинарный вектор рLH*.

Точечные мутации были введены в конструкцию BMB1 методом ПЦР с частично перекрывающимися праймерами для получения рLH-GFP-BMB1-mut1, рLH-GFP-BMB1-mut2, рLH-GFP-BMB1-mut3 и рLH-GFP-BMB1-mut4. На первом этапе получали набор продуктов ПЦР, используя ранее описанную конструкцию рLH-GFP-BMB1 в качестве матрицы и праймер Left с одним из следующих праймеров: BMB1-mut1-M, BMB1-mut2-M, BMB1-mut3-M или BMB1-mut4-M. Второй набор продуктов ПЦР получали с использованием той же матрицы, праймера Right и одного из праймеров: BMB1-mut1-P, BMB1-mut2-P, BMB1-mut3-P или BMB1-mut4-P. На втором этапе соответствующие пары продуктов ПЦР объединяли вместе путем амплификации с праймерами Left и Right. Полученные фрагменты ДНК BMB1-mut1 и BMB1-mut2 обрабатывали эндонуклеазами

рестрикции *XhoI-BglII* и клонированы в аналогично расщепленную конструкцию pLH-GFP-BMB1.

Для получения TRV-BMB1 кодирующая последовательность BMB1 была амплифицирована с помощью праймеров BMB1-TRV-Mfe-P и BMB1-TRV-Xho-M, используя pLH-BMB1 в качестве матрицы. Продукт ПЦР был обработан эндонуклеазами рестрикции *MfeI-XhoI* и клонирован в вектор на основе TRV RNA2 (MacFarlane, Popovich, 2000), обработанный рестриктазами *EcoRI-XhoI*.

Для получения конструкции pLH-NLS-BMB1 фрагмент, кодирующий NLS, был получен путем отжига и удлинения праймеров NLS-M и NLS-P и расщеплен эндонуклеазами рестрикции *XhoI-SacI*, в то время как кодирующая последовательность BMB1 была амплифицирована с помощью праймеров BMB1-P-SacI и Right и расщеплена *SacI-XbaI*. Оба продукта рестрикции были клонированы в бинарный вектор pLH* по *XhoI-XbaI*.

Для получения pLH-NES-BMB1, pLH-NES2-BMB1 и pLH-Flag-BMB1 фрагменты ДНК NES, NES2 и FLAG были получены путем отжига и удлинения пар специфических праймеров (Таблица 1) и расщеплены ферментами *XhoI-SacI*, в то время как кодирующая последовательность BMB1 была амплифицирована с помощью праймеров BMB1-P-SacI и Right и расщеплена ферментами *SacI-XbaI*. Оба продукта рестрикции были клонированы в бинарный вектор pLH* и расщеплены ферментами *XhoI-XbaI*.

Для получения конструкций NES и NES2, слитых с GFP, кодирующая последовательность GFP была вырезана путем расщепления *XhoI-BamHI* из ранее описанной конструкции GFP-BMB2 и клонирована в аналогично расщепленные pLH-NLS-BMB1, pLH-NES-BMB1 или pLH-NES2-BMB1.

Для получения pLH-GFP-Flag-BMB1 кодирующая последовательность GFP была вырезана путем обработки эндонуклеазой рестрикции *NcoI* из pLH-GFP-BMB1 и клонирована в аналогично расщепленный pLH-Flag-BMB1.

Все полученные конструкции были проверены секвенированием.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе.

для получения мутантов BMB2	
BMB2-mN-P	GCCTCGAGACCATGCCAATTGCTGGAGGTTTCAGCGGGGGG TAACGCGCCCGTGTGGTTT
BMB2-mHydr-P	GTGTTGTTTGTGGTTGCTAGCATAGCTGTTATAGCG
BMB2-mMid-ovl-P	TATAATGTACCTTTGAGTCCTGGTACCGTGTTCGGTTTCAG CGCAGAGTACGC
BMB2-mMid-ovl-M	ACCAGGACTCAAAGGTACATTATAAGAACCTGCAGGATTA AAGAAG
для амплификации фрагментов на матрицах на основе рLH*	
Right	ССТТАТСТГГГААСТАСТСАСАТТ
Left	ТАТСТТСТГСААГАСССТТСТСТ
для получения мутантов BMB1	
BMB1C-d22-M	CGCTCTAGATТАСТГГАААТТАТСАТGGTCTACCAC
BMB1C-BglII-P	GTCTGATGTTGAGTTTGTGCG
BMB1-mut1-M	CTATAACCACCACTCCTATACTCATCC
BMB1-mut1-P	GAGTATAGGAGTGGTGGTTATAGGAGT
BMB1-mut2-M	GCAGAGCTAACAGCTGGTAGTGC
BMB1-mut2-P	CTACCAGCTGTTAGCTCTGCTGA
BMB1-mut3-M	CCAGAGAGGATCCGGAAGCACCG
BMB1-mut3-P	GCTTCCGGATCCTCTCTGGAGTCT
BMB1-mut4-M	GCCCGGAGACGTGCCCTGTAAAC
BMB1-mut4-P	AGGGCACGTCTCCGGGCTGGTAG
для клонирования NLS-BMB1	
NLS-M	CAGAGCTCCCAGGGTCTTCTACCTTTCTTTTCTTCTTTGGG
NLS-P	GGCTCGAGACCATGGGATCCCCAAAGAAGAAAAGAAAGG ТА
для клонирования NES-BMB1	
NES-M	CAGAGCTCCCАТТААТАТССААТССАГСААГСТТСААТГСА АГ
NES-P	GGCTCGAGACCATGGGATCCGAАСТТГСАТТГААГСТТГС ТГГ
для клонирования NES2-BMB1	
NES2-M	CAGAGCTCCCCAAAGTAAGTCTTTCCAATGGAGGCAАТТГ АА
NES2-P	GGCTCGAGACCATGGGATCCCTTCAАТТГССТСАТТГГАА А
для клонирования FLAG-BMB1	
FLAG-Sac-M	CAGAGCTCTTACCSTTGTСАТCGTСАТCCTTGTAATCAGAG
FLAG-Xho-P	GGCTCGAGACCATGGGAAGCTCTGАТТАСААГГАТГАСГА Т
для получения промежуточной конструкции для клонирования слитных с BMB1 NLS, NES, NES2 и FLAG	
BMB1-P-SacI	GGGAGCTCTGTGGAGAGTTTTAАТТАТGTGACTTC

Продолжение таблицы 1.

для клонирования TRV-BMB1	
BMB1-TRV-Mfe-P	GCGCAATTGACCATGGAGAGTTTTAATTATGTGACTTC
BMB1-TRV-Xho-M	GCCTCGAGTTAAAGTACGTAAAAATCACCTCTCA
для детекции мРНК 9LOX	
Nb9LOX-det-R	CTTGAGCTCTTCATACGCGGG
Nb9LOX-det-F	GATAAGAAAGACGAGCCTTGGTGG
для детекции мРНК F-box	
F-Box-F	GGCACTCACAAACGTCTATTTC
F-Box-M	ACCTGGGAGGCATCCTGCTTAT
для получения кДНК	
Oligod(T)	TTTTTTTTTTTTTTTV

Аmplification фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ПЦР проводили в 50 мкл в пробирках объемом 0,5 мл. На реакцию брали около 100 нг ДНК, 5 мкл 10x Encyclo-буфер (Евроген, Россия), 1 мкл смеси дНТФ в концентрации 10 mM каждый (Thermo Fisher Scientific, США), соответствующие праймеры по 2,5 мкл каждого в концентрации 10 мкМ, 1 мкл 50X Encyclo-полимеразы (Евроген, Россия) и доводили до объема 50 мкл деионизированной водой. Сверху на реакционную смесь наслаивали 50 мкл минерального масла для предотвращения испарения реакционной смеси. Для проведения ПЦР использовали ДНК-амплификатор «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Предварительное плавление ДНК осуществляли при 95°C в течение 3 минут. Цикл ПЦР выглядел следующим образом: плавление ДНК: 95°C, 30 секунд; отжиг праймеров в течение 45 секунд при температуре, рассчитанной для каждой индивидуальной пары праймеров с использованием веб-сервиса OligoCalc (<https://oligoCalc.eu>); амплификация 72°C в течение времени рассчитанного по принципу 1000 нуклеотидов амплифицируемого фрагмента за 1 минуту. Амплификацию проводили 30-32 цикла.

Очистка ПЦР-продукта

Полученный ПЦР-продукт доводили деионизированной водой до 300 мкл, добавляли равный объем фенола в хлороформе и центрифугировали при 5000 об/мин в течении 10 минут. Аккуратно отбирали водную фазу, добавляли 5 мкл 3M ацетата калия и 900 мкл 96% этанола. Центрифугировали при 15000 об/мин в течении 10 минут, после

чего промывали осадок 75% этанолом, центрифугируя при 15000 об/мин в течении 10 минут. Осадок высушивали при 37°C и растворяли в 30 мкл деионизированной воды.

Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции

Для реакций рестрикции использовали либо ферменты фирмы (Thermo scientific, США) либо (Сибэнзим, Россия) с применением оптимальных буферов, прилагающихся к ферментам и в соответствии с прилагающимся протоколами.

Электрофорез в агарозном геле

Для проведения электрофореза, пробы ДНК смешивали с 6-ти кратным буфером для нанесения (6X DNA Loading Dye) фирмы (Thermo Scientific, США) и наносили на 1-2% агарозный гель с добавлением этидиум бромид (0,01%). Электрофорез проводили в буфере ТБЭ (0,089 М трис-борат, 0,002 М ЭДТА, рН 7,8) при напряжении 165 В.

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля

Кусочки агарозного геля, соответствующие необходимым фрагментам ДНК визуализировались под УФ лампой, вырезались из геля и помещались в 1,5мл пробирки. Экстракцию ДНК из вырезанных кусочков агарозного геля проводили с помощью набора «DNA Extraction Kit» фирмы (Thermo Scientific, США) согласно прилагаемому протоколу.

Лигирование

Лигирование фрагментов ДНК с совместимыми липкими концами проводили с использованием T4 ДНК – лигазой (Thermo Scientific, США) согласно прилагаемой инструкции.

Получение компетентных клеток *E. coli*

Клетки *E.coli* растили в 5мл жидкой стерильной LB с добавлением 20 мкг/мл тетрациклина, в случае клеток штамма XL1-BLUE или без добавления антибиотиков в случае штамма BL-21, не имеющего собственной устойчивости, и растили в течение 12 часов при 37°C и постоянном качании. Ночную культуру добавляли в жидкую среду LB с добавлением тетрациклина или без него (в случае XL1-blue и BL-21, соответственно) и доращивали в тех же условиях до оптической плотности OD600 = 0,4-0,5. Затем клеточную культуру инкубировали на льду при постоянном качании в течение часа. Клетки собирали центрифугированием при 3500 об/мин и температуре 4°C. Все дальнейшие манипуляции проводили в ламинаре на льду. Осадок ресуспендировали в ледяном стерильном TSS-буфере (на 10 мл буфера - 1,3 г PEG, 0,7 мл ДМСО, 0,7 мл 1M MgCl₂, дистиллированная вода). Полученную суспензию бактерий инкубировали на льду

в течение 30 минут, после чего разаликвочивали и замораживали в жидком азоте. Аликвоты компетентных клеток хранили в низкотемпературном холодильнике при -72°C .

Трансформация клеток *E. coli*

Аликвоту компетентных клеток переносили в лед непосредственно из низкотемпературного холодильника и инкубировали на льду в течение 10 минут. По истечении времени инкубации добавляли к компетентным клеткам плазмидную ДНК или лигазную смесь и снова инкубировали на льду в течении 10 минут. Затем переносили в водный термостат на 42°C и выдерживали в течении 2 минут, после чего снова переносили в лед и оставляли на 10 минут. После этого добавляли 400 мкл стерильной жидкой среды LB и инкубировали в течение часа после чего высевали на чашки Петри, содержащие твердую среду LB с добавлением соответствующих антибиотиков. Чашки инкубировали ночь при 37°C после чего отбирали единичные колонии и использовали их для дальнейшей работы.

Выделение плазмидной ДНК

Клетки единичных колоний, полученных после трансформации *E. coli*, инкубировали в 2 мл жидкой LB с добавлением соответствующих антибиотиков в течении 12 часов при 37°C и постоянном качании. Бактериальные культуры осаждали центрифугированием при 8000 об/мин, ресуспендировали осадок в 250 мкл деионизированной воды, добавляли 250 мкл второго лизирующего раствора (0,2 М NaOH, 1% SDS), аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 4 минут. Затем добавляли 250 мкл третьего лизирующего раствора (3М ацетат калия) и инкубировали на льду в течение 5 минут. Полученный лизат центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 минут и переносили супернатант в новую пробирку. К супернатанту добавляли 700 мкл 96% этанола и центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 минут. Аккуратно сливали супернатант, а к осадку добавляли 500 мкл 70% этанола, снова центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 минут, аккуратно отбирали супернатант и сушили осадок при 37°C в течение 15 минут. Осадки растворяли в 50 мкл деионизированной воды.

Очистка плазмидной ДНК ацетатом аммония

К 50 мкл растворенной плазмидной ДНК добавляли 50 мкл 7,5М AcNH_3 и замораживали в жидком азоте. После чего центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 минут и аккуратно отбирали супернатант в новую пробирку. К супернатанту добавляли 1 мл 96% этанола и центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 минут.

Аккуратно сливали супернатант, а к осадку добавляли 500 мкл 70% этанола, снова центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 минут, аккуратно отбирали супернатант и сушили осадок при 37°C в течение 15 минут. Очищенные осадки растворяли в 30 мкл.

Синтетические гены

Нуклеотидная последовательность, кодирующая BMB1, была оптимизирована для экспрессии белка в клетках *E. coli*. Кодон-оптимизированный ген BMB1 и ген BMB2-QTY были синтезированы (Evrogen, Россия) и клонированы в pET-33b(+) (Novagen, США). Нуклеотидные последовательности синтетических генов BMB1 и BMB2-QTY приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Последовательности синтетических генов, использованных в работе.

BMB1	GGATCCGATGGAAAGCTTCAACTACGTTACCTCTGCGGATCTGGTTTG CTCCCTGTCTCGTTTTTCGTGACTTCTACAAGGAACGTAGCGCGTCTCTG TCTGACGACGACGTTTACGCGGACACCACCCGTGAATACTCTGCTGCC CTGGACAGCACCGAATTCGTAGATTACAACCTCCAGATCTTTCTGCTG AACGGTGTGCCAGGTGGCGGTAACAAACAAATTCGTCTACGAAAACGT TGAAGTGCGTAACTCTTGCGTTGTTGTTCCGTTTAAAGCTCTGAAAGA CGAGTACCGCAAACGTGGTTACCGTTCCTTCACCCAGTTCGGTGCACCT GCCGTCCGTTTCGTTCCGCAGACATCCTGGTAATCGATGAATACACCTG CGTGTGCTACTCTGTTCTGGTGAGCCTGGTTTACAAACTGCGTCCGGC AACCGTTGCCCTGATCGGTGACTTTAATCAGTGCTGGATTTCGTGACGG CGAGGGTTTCTCTATGGAACCGTTTGTAGCACCCCTGGTGGTGAACAA GTACCTGTCCGTTTGCTACCGCTGTCCGTGTCCGGACGTAGAGTTTGT CGTAACTACCTGGACCTGGACATTACCCCGGGCAAATGCGGCTCCACC TGTAGCTGCACCGGCTTCAACGTAGAAACCCTGGTTGAAGGTATGACC TTCGATTACCGCGGTGAAGTTGCGCTGGTGTTCAGCGGCGCGAGCAA TCCTACCTGGAGTCTATCGGCGTTTCCGCTGTAACCGTCCGTAGCTTCA TGGGTAAGCAGGCAGATACCGTTGCGCTGTTCATCCTGAAAGATCACG ACATCCGTCTGCTGGGCGTTTCTTCTCTGAAGCTGGTAGCATTTACCCG TCACGTTAGCAAACCTGGTTGTTTACAGCGATATGTCCCACGATGATGT GGTCGCTCTGATCGAAGGTGCGACTGAGTCTGGCGAAGTGGTTGACCA CGATAACTTCCAGCCGGCGTACGAGGA CAGCCTGGAACAGTACTTTCGACCGCCTGCTGCGTGGCGACTTCTACGT TCTGTAACCTCGAG
BMB2- QTY	CTCGAGACCATGCCGATATTTCAAGGTCAAGCGAAGAGTAACGCGCC CACTCAATATACATGTGCTAGTACATGTACTACAGCGTATTACTACTA TAATCCTGGTAATCCTTATAATGTACCTTTGAGTCCCTGGTCACGTGTTC CCTTTCGGGGGAGAGTACGCGGTTTCATGCTAGGTTCAATGGACCGAGT TTCCCTCTTAGTATGGGTGGTTCTAGTACAGGACAGCAAATGCAGTGT ACTACACAACAACCTACTACTACGCATATGTAATCTAGA

Экспрессия белка в бактериях

Клетки *E. coli* были трансформированы экспрессионными векторами, после чего были отобраны клоны с наиболее высокими уровнями экспрессии. Выбранные клоны выращивали в течение ночи при 37°C в среде 2YT в присутствии соответствующих антибиотиков. Ночную культуру разбавляли в 10 раз и растили при 37°C до оптической плотности при 600 нм (OD600) = 0,8. Экспрессию белка индуцировали добавлением 1М изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (конечная концентрация 1–2 мМ) и инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 4500g. Рекombинантные белки, несущие N-концевую 6xHis-метку, очищали на Ni-NTA агарозе в соответствии с протоколом выделения белков «The QIAexpressionist» (Qiagen, Польша) в денатурирующих условиях. Фракции очищенных белков анализировали методом SDS-PAGE ПААГ-электрофореза в 15% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием Кумасси синим.

Диализ белков

Для диализа использовали диализные мешки (SERVAPOR dialysis tubing, MWCO 12000-14000), в соответствии с прилагаемой инструкцией. Условия диализа были подобраны экспериментально, исходя из значений изоэлектрической точки белков, посчитанной с помощью веб-сервиса ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Диализ BMB2-QTY проводили против Milli-Q, после чего неренатурировавший белок осаждали центрифугированием при +4°C при 12000g. Концентрации диализованных белков измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) при 280 нм, а для получения истинных значений концентраций использовали закон Бугера-Ламберта-Бэра. Молекулярную массу белка и коэффициент экстинкции определяли с помощью веб-сервиса ProtParam.

ПААГ-электрофорез

Аликвоты анализируемых образцов смешивали с 4x sample buffer (100mM Трис-НCl, pH=6,8, 100mM β-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 4% додецилсульфат натрия, 0,1% бромфеноловый синий) и инкубировали в течение 5 мин при 95°C. SDS-PAGE проводили в трис-глициновом буфере (ТГБ) (0,025M Трис-НCl, pH=8,3, 0,192M глицин, 0,1% SDS). Нижний разделяющий гель имел состав: 0,4M Трис-НCl, pH=8,8; 15% акриламида, 0,15% метиленбисакриламида и 0,1% SDS. Для полимеризации геля применялся персульфат аммония (PSA) и тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД). Верхний концентрирующий гель

имел состав 0,0125М Трис-НСl, рН=6,8; 4% акриламида, 0,08% метиленбисакриламида, и 0,1% SDS. Электрофорез проводили в приборе фирмы (Hoeffer Scientific, США) при напряжении 135 В и силе тока не выше 40мА. В качестве маркеров молекулярных масс наносили PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

Вестерн-блот анализ

Листья *N. benthamiana* измельчали в порошок в жидком азоте и лизировали в буфере, содержащем три части Трис-НСl, рН 7,5 и одну часть 4× буфера для образцов Леммли (100 мМ Трис-НСl рН 6,8, мМ β-меркаптоэтанола, 10% глицерина, 4% SDS, 0,1% бромфенолового синего). Образцы денатурировали при 95 °С в течение 5 мин и очищали от клеточного дебриса центрифугированием. Белки разделяли в 12% SDS-PAGE ПААГ и переносили на мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) Hybond-P (GE Healthcare Bio-Sciences, США). Для обнаружения белков использовали кроличьи антитела против GFP, конъюгированные с пероксидазой (Rockland, США). После инкубации с антителами полосы визуализировались с помощью хемилюминесценции с использованием системы ECL (GE Healthcare Bio-Sciences, США).

Far-Western-блот анализ

Рекомбинантные белки разделяли методом SDS-PAGE (приблизительно 1 мкг белка на гель) с использованием 15% ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. После переноса мембрану окрашивали 0,1% раствором Понсо S, фотографировали и быстро промывали дистиллированной водой для удаления красителя. Перенесенные белки затем денатурировали в 50 мМ Tris-НСl рН 7,5, с 8 М мочевиной и 0,05% буфером Tween в течение 40 мин при комнатной температуре. Ренатурацию белка и забивку мембраны проводили путем инкубации мембраны в 5% буфере tTBS на основе обезжиренного молока (0,01 М Трис-НСl рН 7,6, 0,0675 М NaCl, 0,1% Твин-20) с 1 мМ ДТТ и 3 мМ MgCl₂ в течение 2 часов, меняя буфер каждые 20–30 минут, а затем оставляли при 4°С на ночь. На следующий день к мембране добавляли свежедиализированный белок BMB2-QTY (5 мкг/мл) в буфере tTBS, дополненном 1 мМ ДТТ, 3 мМ MgCl₂ и 200 мМ NaCl. Мембрану инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре, затем в течение ночи при 4°С и по окончании ночной инкубации промывали 5 раз буфером tTBS без добавок. Связанный белок детектировали методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител к BMB2-QTY (Almabion, Россия)

Трансформация агробактерий

Бинарными векторами трансформировали клетки бактерий *Agrobacterium tumefaciens* (штамм C58C1) с использованием метода замораживания-оттаивания. Для этого клетки бактерий *A. tumefaciens* штамма C58C1 растили в 5 мл жидкой среды LB с добавлением рифампицина (100 мкг/мл) в течение 16 часов при качании и температуре 28°C. Затем 500 мкл ночной культуры смешивали с 3 мкл плазмидной ДНК концентрацией 0,5 мкг/мкл, перемешивали и инкубировали во льду в течение 10 минут. Затем клетки замораживали в жидком азоте и переносили в термостат, выставленный на 37°C на 10-12 минут до размораживания. К клеткам добавляли 1 мл жидкой среды LB и инкубировали при 28°C на протяжении 3 часов с постоянным качанием. По завершении инкубации высевали клетки на чашки петри со средой LB с добавлением 2% агара, содержащей соответствующие антибиотики. в зависимости от устойчивости используемого вектора: рифампицин (100 мкг/мл), спектиномицин (50 мкг/мл), стрептомицин (20 мкг/мл), канамицин (50 мкг/мл) и выращивали при 28°C в течение 3 суток. Выращенные единичные колонии использовались для дальнейшей работы. Полученные агробактериальные культуры хранили при -72°C в низкотемпературном холодильнике с добавлением 25% глицерина.

Агроинfiltrация

Ночные культуры агробактерий выращивали в жидкой среде LB с добавлением соответствующих антибиотиков, 10 mM 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), pH 5,5, и 20 мкМ ацетосирингона при 28 °C в течение 16 часов при постоянном качании. Клетки осаждали центрифугированием при 1000g и ресуспендировали в буфере для инfiltrации (10 mM MES, pH 5,5, 10 mM MgCl₂, 150 mM ацетосирингона). Полученные клеточные суспензии инкубировали при 28°C в течение 3 часов.

Перед инfiltrацией суспензии *A. tumefaciens* разбавляли до конечной оптической плотности OD₆₀₀ = 0,3. Для тестов по комплементации транспорта, суспензии клеток агробактерий, несущих конструкцию PVX-POL-GFP разбавляли до конечной оптической плотности OD₆₀₀ = 0,0001 для получения индивидуально трансформированных растительных клеток. Абаксиальную поверхность листьев *N. benthamiana* инfiltrировали с использованием 2-мл шприца без иглы.

Выделение тотальной РНК

Навески образцов тканей листа по 100 мг замораживали в жидком азоте и выделяли тотальную РНК с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) в соответствии с прилагающимся протоколом производителя. По завершении выделения, полученные образцы обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКаз (Thermo scientific, США) согласно инструкции к ферменту.

Получение кДНК

Получение кДНК на матрице тотальной РНК осуществляли с помощью фермента RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo scientific, США) согласно инструкции к ферменту с использованием праймера oligod(T), последовательность которого представлена в таблице 1.

Количественная ПЦР

Полученные кДНК использовались в качестве матрицы для реакций ПЦР в реальном времени, проводимых с использованием набора qPCRMix M-440 (Synthol, Россия) и праймеров, специфичных для мРНК 9-LOX или праймеров, специфичных для мРНК белка F-box *N.benthamiana*, который был выбрана в качестве референсного гена (последовательности праймеров представлены в таблице 1). Анализ ПЦР в реальном времени проводился с использованием прибора CFX Connect Real-Time PCR System (Bio-Rad, США). Значение C_t (пороговое значение цикла) для мРНК 9-LOX было нормализовано относительно мРНК референсного гена F-box. Для статистического анализа данных применялся непарный двухсторонний t-критерий Стьюдента.

Конфокальная микроскопия и визуализация комплементации транспорта

Субклеточную локализацию белков визуализировали на третий дни в эпидермальных клетках *N. benthamiana*. Диски листьев исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа C2plus (Nikon, Япония), оснащенного объективом с водной иммерсией $\times 60$ (1,2 NA). Длины волн возбуждения составляли 488 нм для GFP, 548 нм для mRFP и 405 нм для анилинового синего. Изображения были получены при длине волны 495–545 нм для GFP, при длине волны 580–640 нм для mRFP и 416–490 нм для анилинового синего и обработаны с помощью программного обеспечения Nikon NIS Elements или ImageJ.

Анализы комплементации транспорта проводились под длинноволновым УФ-светом (365 нм) с использованием лампы Black-Ray B-100AP (UVP, Великобритания) или

с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon C2plus, оснащенного объективом $\times 10$, а размеры очагов измерялись с помощью программного обеспечения Nikon C2plus.

Конфокальная микроскопия в режиме сверхвысокого разрешения AiryScan проводилась с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 900 (Carl Zeiss AG, Германия), оснащенного 63-кратным объективом с масляной иммерсией и блоком детекции AiryScan. Программное обеспечение ZEN Blue 3.4 использовали для деконволюции с фильтром Винера и реконструкции полученных изображений.

FRET-FLIM

Пары исследуемых на предмет взаимодействия белков, один из которых слит с GFP, а другой - с mRFP были коэкспрессированы в листьях *N. benthamiana*. Также использовались отрицательные контроли без акцептора или с акцептором, не слитным с исследуемым белком. Измерения FRET-FLIM проводились с помощью системы визуализации времени жизни флуоресценции LIFA (Lambert Instruments, Нидерланды) или конфокальной сканирующей системы с регистрацией времени жизни флуоресценции DCS-120 TCSPC (Becker и Hickl, Германия).

Изображения получали в зеленом и красном каналах, для зеленого канала использовали длину волны возбуждения 480 нм, эмиссию регистрировали с фильтром 525/50 нм; для красного канала использовали длину волны возбуждения 540 нм, эмиссию регистрировали с фильтром 580/40 нм. С помощью библиотеки OpenCV в Python, используя опцию threshold производили оконтуривание PAMBs, экспрессирующих mRFP. Время жизни флуоресценции анализировалось в каждом пикселе PAMBs, используя программное обеспечение SPCImage Becker&Hickl. Для каждого PAMB находили среднее значение времени жизни, суммируя значения для каждого пикселя и деля на их количество.

Независимые эксперименты повторялись 3–10 раз. В каждом эксперименте для каждой пары коэкспрессируемых белков использовалось не менее трех листьев. Измерения проводились как минимум в восьми областях по 3–8 эпидермальных клеток, расположенных в разных областях листа. Исходные данные, содержащие информацию о времени жизни, анализировались в Microsoft Excel для расчета средних значений времени жизни и стандартных отклонений. Для статистического анализа использовались двухсторонние параметрические t-критерии Стьюдента. Эффективность FRET

рассчитывалась по формуле $E = 1 - (TDA/TD)$, где TDA — время жизни донорного флуорофора (GFP) в присутствии акцепторного флуорофора (mRFP), а TD — время жизни донора в отсутствие акцептора.

Выделение мембранной фракции и эксперименты по химическому сшиванию

Мембранную фракцию выделяли по методике описанной в (Abas, Luschnig, 2010). Листья *N. benthamiana*, замороженные в жидком азоте растирали порошок и ресуспендировали в экстракционном буфере из расчета 1:1 (EB; 100 мМ Hepes, pH 7,5; 25% сахарозы, 5% глицерина, 10 мМ ЭДТА, 5 мМ KCl, 1 мМ DTT, 1 мМ Фенилметилсульфонилфторида (PMSF), ингибитор протеаз). Гомогенаты предварительно осветляли при 600 g, а затем при 1500. Осветлённый гомогенат разаликвочивали по 200 мкл в пробирки на 1,5 мл. Мембранную фракцию осаждали центрифугированием при 21000g в течение 2 часов. Осадки промывали промывочным буфером (50 мМ Hepes, pH 7,5; 5 мМ EDTA и 1 мМ PMSF) и повторно центрифугировали при 21 000g в течение часа. Все этапы проводили на льду или в охлажденной до 4°C микроцентрифуге. Затем мембранные осадки ресуспендировали в реакционном буфере (100 мМ Hepes, pH 7,5; 5% глицерина, 10 мМ EDTA, 5 мМ KCl, 1 мМ PMSF).

Для экспериментов по сшиванию, кросслинкер этиленгликоль-бис(сукцинимидилсукцинат) (EGS) (Merck, Германия) растворяли в ДМСО до конечной концентрации 30 мМ. Выделенную мембранную фракцию инкубировали с EGS в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем реакцию нейтрализовали добавлением 1 М Трис-HCl, pH = 7,5, до конечной концентрации 20 мМ и инкубировали еще в течение 30 мин. По завершении обработок, образцы анализировали методом 12% SDS-PAGE, а комплексы визуализировали стандартными методами иммуоблоттинга с использованием антител к mRFP (Евроген, Россия).

Анализ белковых последовательностей с помощью веб-сервисов

Анализ и предсказания сигналов ядерного импорта и регионов, расположенных на поверхности белковой молекулы, были сделаны с использованием следующих веб-сервисов: NetSurfP (Høie et al., 2022), PredictProtein (Bernhofer et al., 2021), WESA (Chen, Zhou, 2005), DeepREx-WS (Manfredi et al., 2021) и SVMTriP (Yao et al., 2012).

Окрашивание анилиновым синим

Для визуализации отложений каллозы диски листьев инфильтрировали с помощью вакуумного эксикатора раствором анилинового синего (0,1% анилинового синего в 67 мМ

фосфатном буфере, pH 8) и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин перед микроскопическим исследованием (Amarí et al., 2014). Количественный подсчет отложений каллозы у ПД проводили с использованием программного обеспечения CalloseQuant в ImageJ (v. 1.54) (Huang et al., 2022). Регионы интереса (regions of interest, ROI) были выбраны автоматически, используя Метод А со следующими параметрами: пиковое значение было выставлено равным 100, радиус измерения было выставлено равным 4. После автоматического выбора ROI, выделенные области были визуально проверены на предмет локализации в клеточной стенке. Для статистического анализа применялся непарный двусторонний t-тест Стьюдента.

Окрашивание DAB

На третий дни листья подвергали вакуумной инфильтрации и инкубировали в растворе DAB 1 мг/мл (pH 3,8) в течение 6 часов. После окрашивания листья осветляли в 96% этаноле для устранения фонового зеленого цвета.

Обработка лептомицином В

Обработку лептомицином В проводили в конце второго дни. для чего агроинфильтрированные листья повторно инфильтрировали 50 нМ раствором лептомицина В. Конфокальную микроскопию проводили через 10 часов после инфильтрации лептомицином В.

Подготовка образцов для электронной микроскопии

Для ультраструктурных исследований листья *N. benthamiana* нарезались на фрагменты размером приблизительно 5×1 мм и вакуумно инфильтрировались 2,5% раствором глутарового альдегида (ГА) в 100 мМ водном растворе какодилата натрия. Образцы фиксировали в ГА в течение 24 ч, трижды промывали в течение 5 мин в 100 мМ водном растворе какодилата натрия и дополнительно постфиксировали в 1% четырехокиси осмия в 100 мМ водном растворе какодилата натрия в течение 1 ч при +4°C. Затем образцы обезвоживали путем увеличения концентрации этанола (50%–70%–96%). После чего 96% этанол заменяли ацетоном, и пропитывали смесями эпоксидной смолы и ацетона с постепенным возрастанием содержания смолы. В конце заменяли смесь эпоксидной смолы и ацетона на чистую смолу Spi-pon 812 (SPI Supplies, США), и отверждали смолу при +70 °C в течение 48 ч.

Для иммуноэлектронной микроскопии фрагменты листьев аналогичным образом фиксировали 1% раствором ГА в течение 60 мин при +4 °C, после чего промывали

холодным 100 мМ водным раствором какодилата натрия и переносили в 40% этанол на 20 мин, затем в 50% и 70% этанол по 30 мин. Образцы пропитывали смесью смолы LR White и 70% этанола в соотношении 5:1 в течение 1 ч, и затем пропитывали в течение ночи при +4 °С свежей смолой LR White. Затем образцы переносили в силиконовые формы для заливки, заполненные свежей смолой LR White. Формы помещали в герметичный стеклянный контейнер, где заменяли воздух в сосуде на CO₂ для предотвращения ингибирования полимеризации кислородом. Затем смолу LR White отверждали при +55 °С в течение 48 ч.

Ультратонкие срезы толщиной 70 нм и полутонкие срезы толщиной 200 нм для ЭМ-томографии готовили с помощью ультрамикротомы Reichert-Jung Ultracut E, оснащенного алмазным ножом Ultra 45 (Diatome, Нидау, Швейцария).

Для морфологических исследований и ЭМ-томографии срезы монтировали на медные сетки с прорезями, покрытые формваром, и дополнительно окрашивали 1% водным раствором уранил ацетата в течение 1 ч и цитратом свинца в течение 90–120 с.

Для ЭМ-томографии после дополнительного окрашивания срезы покрывали поли-L-лизинном, и наносили коллоидные частицы золота, как описано ранее (He, He, 2014). Затем срезы были покрыты углеродом с помощью вакуумного испарителя HUS-3B (Hitachi, Токио, Япония).

Подготовка образцов для иммуноцитохимического исследования

Срезы в смоле LR White на покрытых формваром золотых сетках были обработаны 10% перекисью водорода в течение 10 мин, тщательно промыты тремя сменами PBS и заблокированы 3% BSA в PBS в течение 60 мин. Кроличьи антитела против GFP и RFP (Евроген, Россия) были разведены в соотношении 1:100 и 1:30 соответственно в PBS с добавлением 0,1% BSA.

Срезы инкубировали в растворе антител при +4°C в течение ночи. Затем срезы промывали три раза по 10 мин в буфере для разведения антител и инкубировали с анти-кроличьими антителами, конъюгированными с 12 нм коллоидным золотом (Jackson ImmunoResearch, Великобритания), разведенными в соотношении 1:100 в том же буфере в течение 1 ч при комнатной температуре. Избыток антител удаляли, промывая срезы один раз в растворе для разведения, три раза в PBS и дважды дистиллированной водой. Затем срезы высушивали на воздухе. Перед наблюдениями срезы постокрашивали 1% водным раствором уранил ацетата в течение 1 ч и цитратом свинца в течение 90–120 с.

Каждый эксперимент повторяли дважды; в каждом повторении исследовали не менее десяти отдельных срезов.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) и томография

Срезы наблюдались и фотографировались с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL, Япония), работающего при напряжении 80 кВ и оснащенного цифровой камерой Quemesa (Olympus Scientific Imaging Solutions, Германия). Эксперимент повторялся дважды; в каждом повторении исследовалось не менее десяти отдельных срезов. Исследования электронной томографии проводились с помощью электронного микроскопа JEM-2100 200 кВ (JEOL), оснащенного катодом LaB₆. Для получения данных томографии использовались три смежных ультратонких среза. Изображения регистрировались с помощью ПЗС-матрицы US1000FTXP (Gatan, США) с размером пикселя 0,97 нм и дефокусировкой –2 мкм. Для фильтрации неупруго рассеянных электронов использовался электронный энергетический фильтр GIF (Gatan) с щелью нулевых потерь 20 эВ. Двухосевые томограммы были получены с помощью SerialEM (v.3.8.16) (Mastronarde, 2005) с диапазоном наклона от –60 до +60 градусов и шагом наклона 1 градус. Обработка изображений проводилась с использованием IMOD (v.4.11.0) (Mastronarde, 1997). Золотые метки использовались как для выравнивания изображений, так и для объединения томограмм, полученных с разных осей наклона и ультратонких срезов. Реконструкция была выполнена с помощью алгоритма фильтрованной обратной проекции с использованием фильтра типа SIRT. Были получены три набора данных ЭМ-томографии; два набора данных использовались для 3D-реконструкции; одна реконструкция была представлена

Обработка и измерения ТЭМ изображений

Обработка томографических изображений выполнялась путем ручного обведения контуров мембраны в GIMP с помощью графического планшета. 3D-модель, основанная на полученных контурах, была собрана и визуализирована с помощью плагина Volume Viewer для FIJI (версия 2.14.0).

Измерения ширины эндоплазматического ретикулума проводились в FIJI. Изображения калибровались с использованием микротрубочек в качестве эталона.

Результаты и обсуждение

1. Изучение взаимодействия белков BMB1 и BMB2 HGSV

1.1 Анализ взаимодействия белков BMB1 и BMB2 *in vitro*

Ранее при исследовании субклеточной локализации белков BMB1 и BMB2 бинарного транспортного блока HGSV в эпидермальных клетках *N. benthamiana* было показано, что белок BMB2 локализуется РАМВs, в то время как белок BMB1 локализуется в цитоплазме и нуклеоплазме. При совместной экспрессии двух белков BMB1 направляется в РАМВs, образованные BMB2 и далее, по каналам ПД в соседние клетки (Lazareva et al., 2017). Этот факт предполагает взаимодействие белков BMB1 и BMB2. Для анализа взаимодействия *in vitro*, белки BMB1 и BMB2 были экспрессированы в клетках *E. coli* и анализированы методом Far-Western-блоттинга. BMB2 является высокогидрофобным белком и потому, для успешной экспрессии в бактериях, его последовательность была оптимизирована. Модификация проходила в соответствии с «QTY-кодом» таким образом, чтобы заменить интегрированные в мембрану спирали на гидрофильные районы. Метод модификации «QTY» используется для бактериальной экспрессии высокогидрофобных белков, которые в своей нативной форме могут быть токсичны для клеток. Подобная модификация решает эту проблему, не нарушая при этом белок-белковые взаимодействия (Zhang et al., 2018). Экспрессированный и выделенный из клеток *E. coli* белок BMB1, а также белок мышинной дигидрофолатредуктазы (DHFR), используемый в качестве отрицательного контроля, были разделены в ПААГ-геле и перенесены на мембрану. Мембрану инкубировали с препаратом выделенного белка BMB2-QTY, который затем детектировали с помощью антител, специфичных к BMB2-QTY. Было обнаружено, что BMB2-QTY взаимодействует с BMB1, но не DHFR (Рис. 2 А). Таким образом было подтверждено взаимодействие исследуемых белков *in vitro*.

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

Для того, чтобы подтвердить взаимодействие белков *in vivo* был использован метод резонансного переноса энергии Ферстера (FRET) с визуализацией времени жизни флуоресценции (FLIM) (Forster resonance energy transfer fluorescence lifetime imaging microscopy visualization, FRET-FLIM). Этот метод основан на возможности безызлучательного переноса энергии между донорным флуорофором (GFP) и акцепторным флуорофором (mRFP) в случае, если они находятся на расстоянии менее 10

нм друг от друга. Детекция FRET при коэкспрессии двух взаимодействующих белков, слитных с GFP и mRFP, возможна на основании уменьшения продолжительности времени жизни флуоресценции донорного флуорофора GFP (Schoberer, Botchway, 2014). Листья растений *N. benthamiana* были агроинфильтрованы для коэкспрессии белков GFP-BMB1 и BMB2-mRFP. Время жизни флуоресценции GFP измерялось в РАМВs, в которых, согласно предыдущим исследованиям, колокализуются белки BMB1 и BMB2 (Рис. 2 С). GFP-BMB1, коэкспрессированный с нативным BMB2, использовался в качестве отрицательного контроля без акцептора, а GFP-BMB1, коэкспрессированный с нативным BMB2 и mRFP использовался как отрицательный контроль, где акцепторный флуорофор присутствует, но не слит с BMB2. Было обнаружено, что время жизни флуоресценции GFP значительно падало в случае коэкспрессии GFP-BMB1 и BMB2-mRFP по сравнению с отрицательными контролями. Падение составляло 0,9 наносекунд (нс), что соответствует эффективности FRET около 36%, что с высокой степенью достоверности подтверждает взаимодействие BMB1 и BMB2 в клетках *N. benthamiana* (Рис. 2В).

В предыдущих исследованиях было обнаружено, что в зависимости от того, с каким из двух концов BMB2 слит флуоресцентный белок, слитные белки BMB2-mRFP и mRFP-BMB2 проявляют разный набор свойств из тех, что присущи белку BMB2 дикого типа. Так, mRFP-BMB2, у которого mRFP находится на N-конце BMB2 не способен направлять транспорт GFP-BMB1 в РАМВs, в отличие от BMB2-mRFP (mRFP с С-конца BMB2), который этой способностью обладает. При этом mRFP-BMB2 сохранял способность вызывать сужение трубочек ЭПР и увеличивать ППС ПД, как и BMB2 дикого типа, в отличие от BMB2-mRFP (Lazareva et al., 2021b; Lazareva et al., 2021a). Исходя из этого, с использованием метода FRET-FLIM мы решили проверить происходит ли взаимодействие пары белков mRFP-BMB2 и GFP-BMB1. Как и ожидалось, коэкспрессия GFP-BMB1 с mRFP-BMB2 не привела к какому-либо значительному снижению жизни флуоресценции GFP (Рис. 2В), предполагая, что mRFP, слитный с N-концом белка BMB2 мешает взаимодействию двух транспортных белков, и, соответственно, в BMB1-BMB2 взаимодействие вовлечен N-конец BMB2.

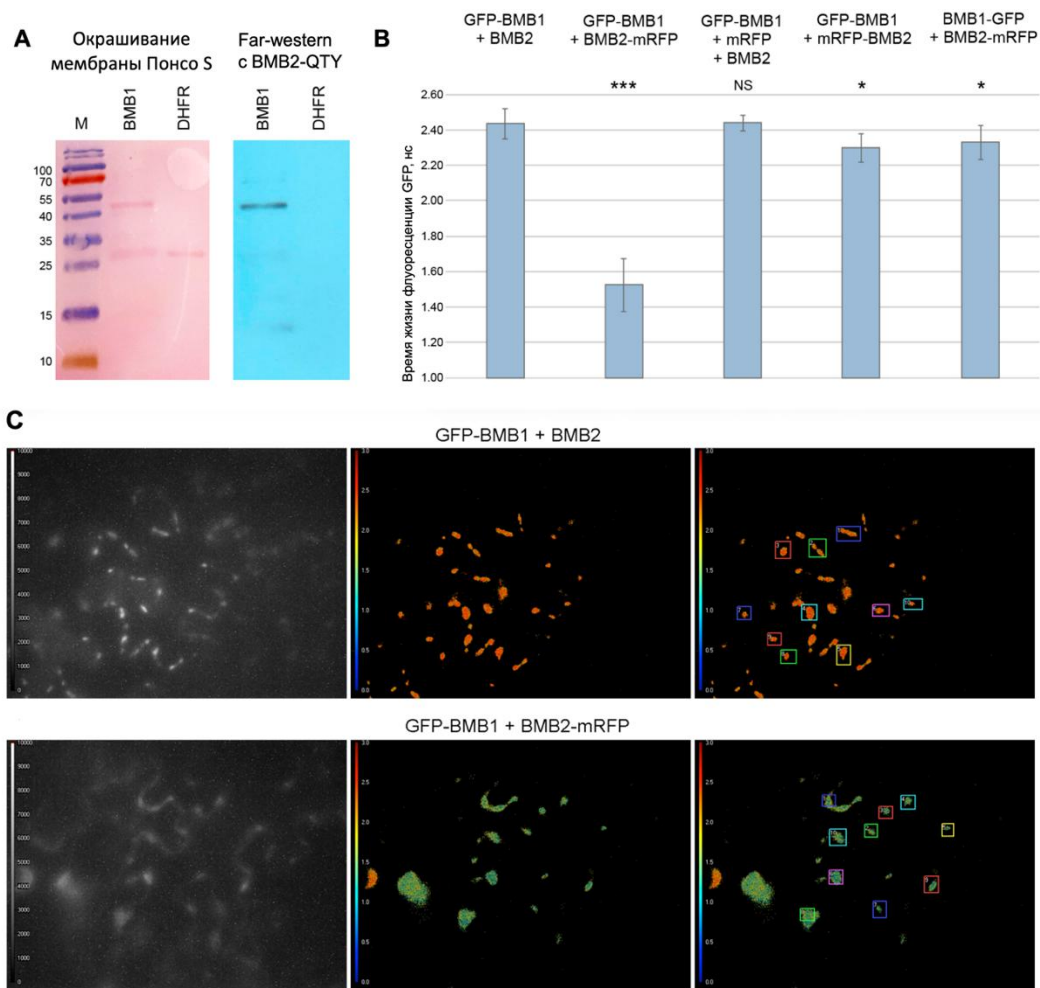


Рисунок 2. Анализ взаимодействия белков BMB1 и BMB2. (А) Анализ взаимодействия методом Far-western блоттинга. В клетках *E. coli* были экспрессированы белок BMB1 и белок BMB2-QTY, представляющий собой модифицированную версию BMB2, не имеющую гидрофобных областей, отвечающих за ассоциацию с мембраной. Слева: мембрана с перенесенными на нее с ПААГ-геля белками, окрашенная с помощью Понсо S (BMB1, 43 кДа; DHFR, 25 кДа). Справа: детекция BMB2-QTY с помощью BMB2-QTY-специфичных антител. М: маркеры молекулярной массы. Размеры отдельных белковых полос указаны в кДа. (В) Результаты FRET-FLIM анализа взаимодействия белков в клетках листьев *N. benthamiana*, агроинфильтрованных для экспрессии BMB1 и BMB2. Столбцы гистограммы обозначают среднее время жизни флуоресценции в наносекундах, планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Звездочками отмечены статистически значимые различия по сравнению с данными для отрицательного контроля GFP-BMB1 + BMB2 (***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$) согласно t-критерию Стьюдента; NS — статистически незначимо ($p \geq 0,05$). (С) FRET-FLIM изображения клеток, экспрессирующих донор флуоресценции GFP-BMB1 либо совместно с акцептором флуоресценции BMB2-mRFP (снизу), либо совместно с нативным BMB2, что служит отрицательным контролем без акцептора (сверху). Левые и правые панели соответствуют интенсивности излучения донора флуоресценции, центральные - отражают тепловую карту времени жизни возбужденного состояния донора флуоресценции. Квадратами отмечены участки измерений, соответствующие РАМВ. Цветом отражено время жизни флуоресценции, при этом красным обозначены области, где время жизни донора флуоресценции не изменялось, а зеленым обозначены участки, где время жизни донора флуоресценции снижалось.

Аналогичным подходом был проверен и белок ВМВ1, слитный с GFP с противоположного конца. Было обнаружено, что коэкспрессия ВМВ1-GFP и ВМВ2-mRFP также не приводит к какому-либо значительному уменьшению времени жизни флуоресценции и составляет порядка 0,11 нс, что соответствует эффективности FRET всего 4,5% (Рис. 2В). Эти данные указывают на то, что GFP, слитный с С-концом ВМВ1 мешает взаимодействию с ВМВ2, предполагая вовлечение С-концевого региона ВМВ1 в ВМВ1-ВМВ2 взаимодействие.

1.3. Картирование участка ВМВ1, вовлеченного во взаимодействие с ВМВ2

Данные, полученные в ходе FRET-FLIM анализа, предполагают, что во взаимодействии с ВМВ2 участвует С-концевой район белка ВМВ1. Для проверки этой гипотезы, был получен мутант белка ВМВ1 с делецией 22 аминокислотных остатков с С-конца - ВМВ1d22. При анализе листьев *N. benthamiana*, агроинфильтрированных для экспрессии слитного с GFP белка ВМВ1d22, с помощью конфокальной микроскопии наблюдалось сохранение локализации белка в цитоплазме и ядре, характерной для GFP-ВМВ1 (Рис. 3 В, С). Однако, в случае GFP-ВМВ1d22, помимо этого наблюдалась также явная концентрация флуоресценции GFP в ядрышке и небольшом субъядерном тельце, что ранее не было описано для субклеточной локализации GFP-ВМВ1. По этой причине был проведен тщательный анализ ядерной локализации GFP-ВМВ1, выявивший клетки, где GFP-ВМВ1, подобно мутанту, локализовался в ядрышке и субъядерном тельце, хотя этот эффект не был так очевиден, как в случае мутантного белка (Рис. 3Е). Таким образом делеция С-концевых 22 аминокислотных остатков значительно увеличивала накопление белка в ядрышке и субъядерном тельце. Позже были проведены попытки идентифицировать природу обнаруженных субъядерных телец и возможную функцию ядерной локализации ВМВ1 (Результаты и обсуждения, раздел 4.1.).

Для анализа способности к взаимодействию GFP-ВМВ1d22 был коэкспрессирован с ВМВ2-mRFP. Пары белков GFP и ВМВ2-mRFP, а также GFP-ВМВ1 и ВМВ2-mRFP, были коэкспрессированы в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. В случае положительного контроля, яркая флуоресценция GFP наблюдалась только в периферических тельцах, образованных ВМВ2-mRFP, и полностью отсутствовала в цитоплазме и ядре, что соответствует описанным ранее литературным данным (Рис. 3G). Мутантный белок GFP-ВМВ1d22 не менял своей локализации в

присутствии BMB2-mRFP, сохраняя ядерно-цитоплазматическую локализацию (Рис. 3H), аналогично тому, как наблюдалось в отрицательном контроле для GFP (Рис. 3F). Надо отметить, что в последних двух случаях слабая по сравнению с положительным контролем концентрация флуоресценции GFP обнаруживалась в ассоциации с RAMBs, что согласуется с литературными данными о том, что образуемые BMB2 RAMBs расположены в цитоплазматических мешках, которые, соответственно, могут содержать диффузно локализованный GFP (Lazareva et al., 2017). Таким образом, делеции 22 аминокислотных остатков с С-конца BMB1 достаточно, чтобы белок терял свою способность направляться в периферические тельца белком BMB2, что свидетельствует о вовлеченности С-концевого района белка в BMB1-BMB2 взаимодействие.

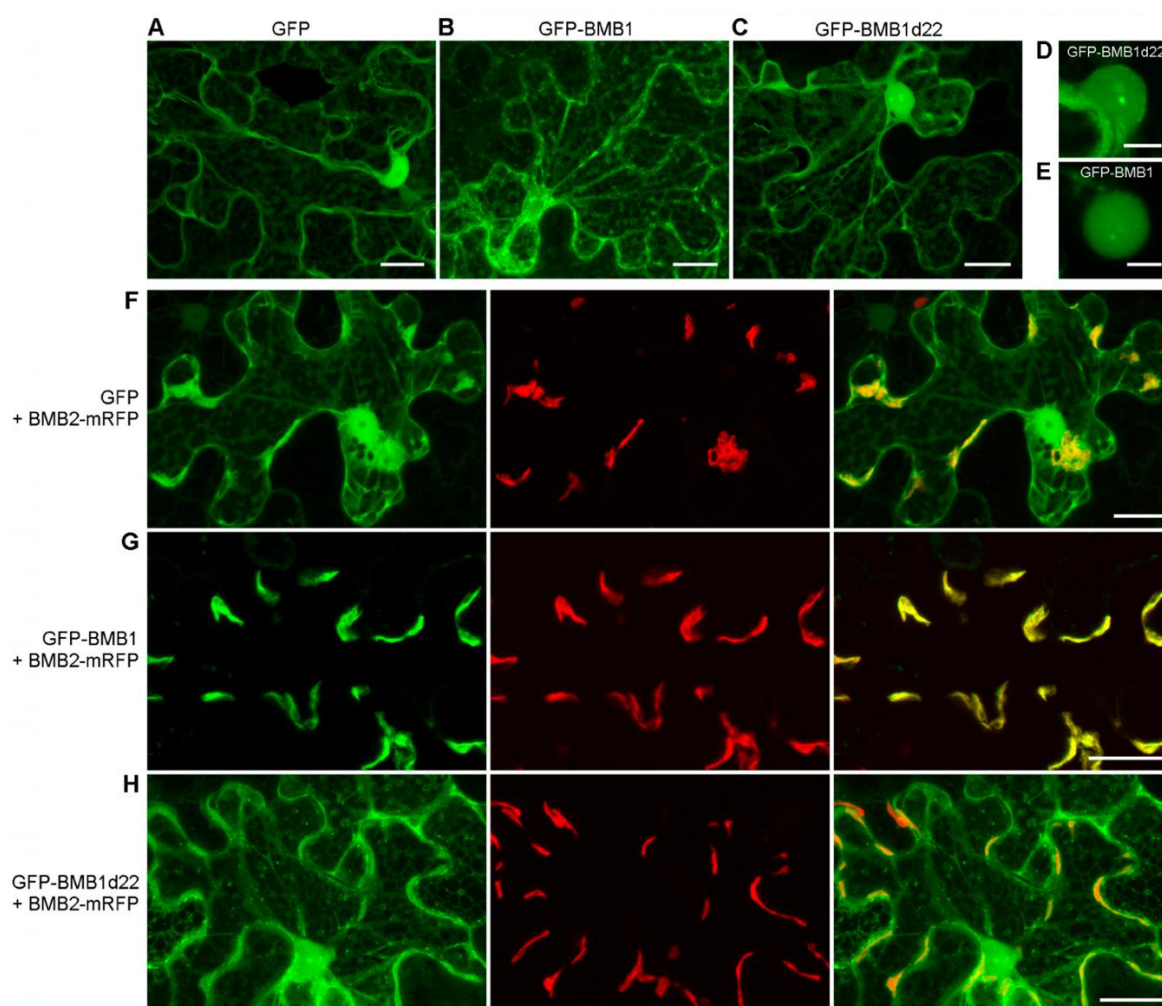


Рисунок 3. Субклеточная локализация GFP-BMB1d22. Субклеточная локализация (А) GFP, (В) GFP-BMB1, (С) GFP-BMB1d22. Увеличенные изображения ядра в клетках, экспрессирующих (D) GFP-BMB1d22 и (E) GFP-BMB1. Кожэкспрессия (F) GFP и BMB2-mRFP, (G) GFP-BMB1 и BMB2-mRFP и (H) коэкспрессия GFP-BMB1d22 с BMB2-mRFP. (F-G) левые изображения соответствуют каналу GFP, центральные - каналу mRFP, а правые - наложению изображений для каналов GFP и mRFP. Изображения реконструированы из Z-серий оптических срезов. Масштабная линейка на изображениях А-С, F-H: 20 мкм, на изображениях D, E: 5 мкм.

Чтобы проверить, влияет ли нарушение взаимодействия белков ВМВ1 и ВМВ2, вызванное делецией 22 С-концевых аминокислотных остатков ВМВ1 на выполняемую ими транспортную функцию, был использован метод комплементации транспорта репортерной конструкции PVX-POL-GFP. PVX-POL-GFP представляет собой конструкцию на основе генома PVX, которая способна реплицироваться и экспрессировать GFP в первично зараженных клетках, но не способна к межклеточному транспорту, так как в ней отсутствуют гены белка оболочки и транспортных белков. При добавлении к этой конструкции функциональной транспортной системы наблюдается образование многоклеточных локусов инфекции, вследствие комплементации транспорта репортерной конструкции транспортными белками. Для экспериментов по комплементации транспорта листья растения *N. benthamiana* инфильтрируются сильно разведенной суспензией агробактерий, несущих конструкцию PVX-POL-GFP, в сочетании с суспензиями агробактерий, несущих конструкции для экспрессии тестируемых белков. В случае коэкспрессии PVX-POL-GFP с пустым вектором на 5 дни наблюдались лишь единичные флуоресцирующие клетки. При этом в положительном контроле коэкспрессия PVX-POL-GFP с ВМВ1 и ВМВ2, приводила к появлению многоклеточных локусов инфекции, свидетельствуя о способности этих белков комплементировать транспорт конструкции PVX-POL-GFP, дефицитной по этой функции (Рис. 4А, В). В аналогичных экспериментах по коэкспрессии PVX-POL-GFP с мутантом ВМВ1d22 и белком ВМВ2 комплементации транспорта не наблюдалось, что демонстрирует необходимость С-концевого региона ВМВ1 для взаимодействия с ВМВ2 и обеспечения этими белками межклеточного транспорта (Рис. 4В).

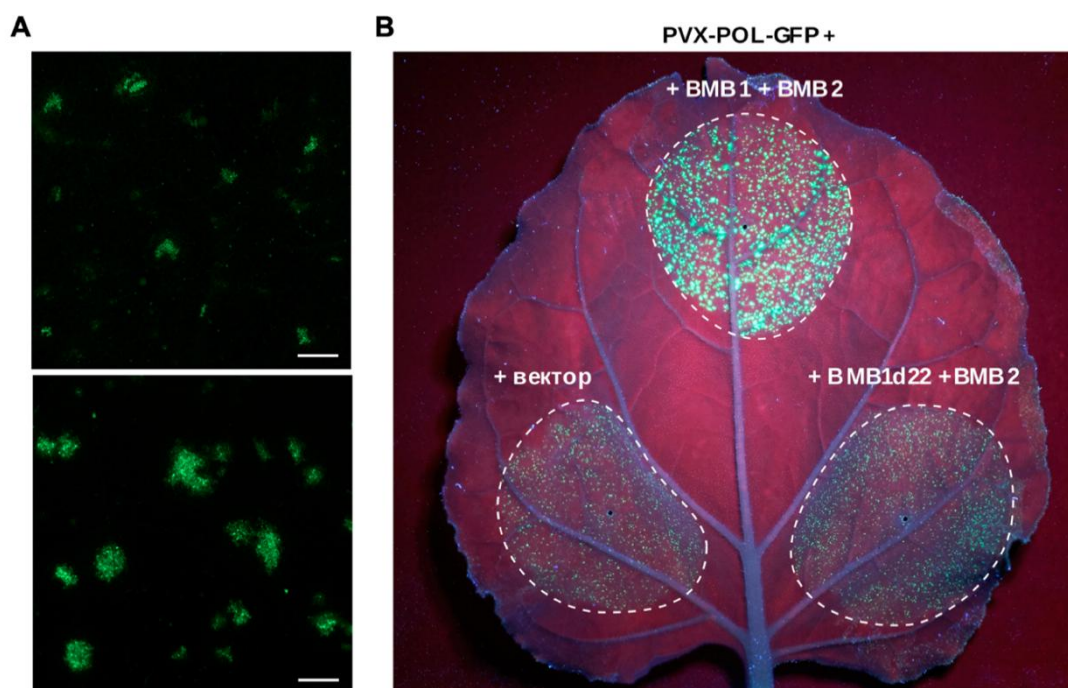


Рисунок 4. Анализ способности мутанта BMB1d22 комплементировать межклеточный транспорт репортерной конструкции PVX-POL-GFP. (А) Флуоресцентная микроскопия клеток *N. benthamiana*, агроинфильтрированных для экспериментов по комплементации транспорта репортерной конструкции PVX-POL-GFP, на 5 дни. Сверху – единично зараженные клетки, наблюдаемые в отсутствие комплементации транспорта, снизу – многоклеточные локусы инфекции, образованные вследствие комплементации транспорта PVX-POL-GFP ТБ HGSV. (В) Лист растения *N. benthamiana* агроинфильтрированный для коэкспрессии PVX-POL-GFP с комбинациями BMB2 с BMB1, BMB1d22 или пустым вектором. Пунктирные линии соответствуют границам областей инфильтрации. Визуализацию проводили с помощью УФ-лампы на 5 дни.

1.4. Картирование региона BMB2, участвующего во взаимодействии с BMB1

После установления региона BMB1, участвующего в BMB1-BMB2 взаимодействии, следующей задачей было идентифицировать районы белка BMB2, участвующие в этом взаимодействии. Ранее было предсказано, что BMB2 - интегральный мембранный белок, содержащий два высокогидрофобных мембранных домена, гидрофильные N-концевой домен и центральный домен, а также 3 гидрофильных аминокислоты с С-конца (Рис. 5) (Morozov, Solovyev, 2012; Solovyev, Morozov, 2017). С помощью сайт-направленного мутагенеза был сделан набор из трех мутантов белка BMB2 для анализа взаимодействий с BMB1 (Рис. 5). Мутант BMB2-mMid содержит точечные мутации в центральном районе белка, затрагивающие аминокислотные остатки, которые, согласно биоинформатическому анализу, консервативны для BMB2-белков. Для получения

мутанта ВМВ2-mN точечные мутации, затрагивающие заряженные, полярные и ароматические аминокислотные остатки, были внесены в неконсервативный N-концевой домен ВМВ2. Также был создан мутант ВМВ2-Hydr, несущий замены двух цистеинов в мембранном домене МВD1, обнаруживаемых в МВD1 доменах других ВМВ2 белков.

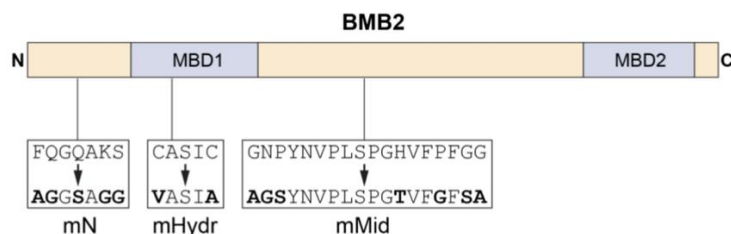


Рисунок 5. Схематическое изображение мутаций, вносимых в белок ВМВ2. Последовательность ВМВ2 изображена в виде прямоугольника с N- и C- концами. Мембранные домены обозначены МВD1 и МВD2, соответственно, а гидрофильные области обозначены бежевым цветом. В белых прямоугольниках снизу отражены точечные аминокислотные замены, внесенные в последовательность белка ВМВ2 для создания мутантов ВМВ2-mN, ВМВ2-mHydr и ВМВ2-mMid.

Анализ субклеточной локализации слитных с mRFP мутантов показал, что мутанты ВМВ2-mN-mRFP и ВМВ2-Hydr-mRFP сохраняют такую же локализацию, как и ВМВ2-mRFP, локализуясь в РАМВs (Рис. 6 А,В,С). Однако мутации, внесенные в ВМВ2-mMid, приводили к нефизиологической агрегации белка в цитоплазматических структурах большого размера, что препятствовало корректной локализации белка (Рис. 6D).

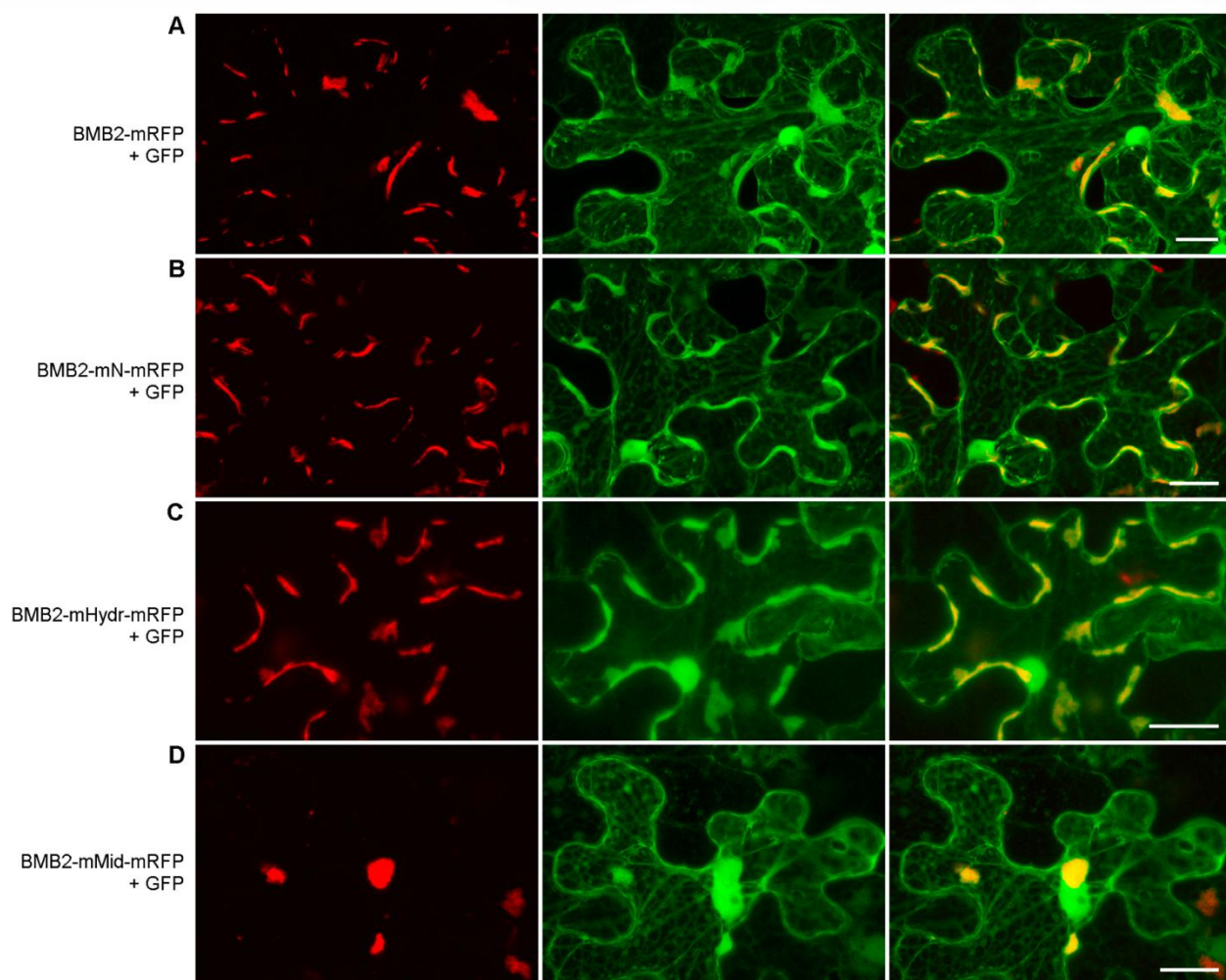


Рисунок 6. Анализ субклеточной локализации мутантов BMB2. (A) BMB2 дикого типа (положительный контроль), (B) BMB2-mN, (C) BMB2-mHydr и (D) BMB2-mMid коэкспрессированные с GFP. Левые панели – канал mRFP, центральные панели – канал GFP, а правые панели – наложение изображений для каналов GFP и mRFP. Все изображения реконструированы из Z-серий оптических срезов. Масштабная линейка: 20 мкм.

Способность мутантов BMB2 направлять межклеточный транспорт была далее проверена в тестах по комплементации транспорта PVX-POL-GFP. Листья *N. benthamiana* были агроинфицированы для коэкспрессии репортерной конструкции PVX-POL-GFP с BMB1 и каждым из мутантов BMB2. Среди протестированных мутантов только BMB2-Hydr сохранял функциональность и был способен поддерживать межклеточный транспорт как белок дикого типа (Рис. 7).

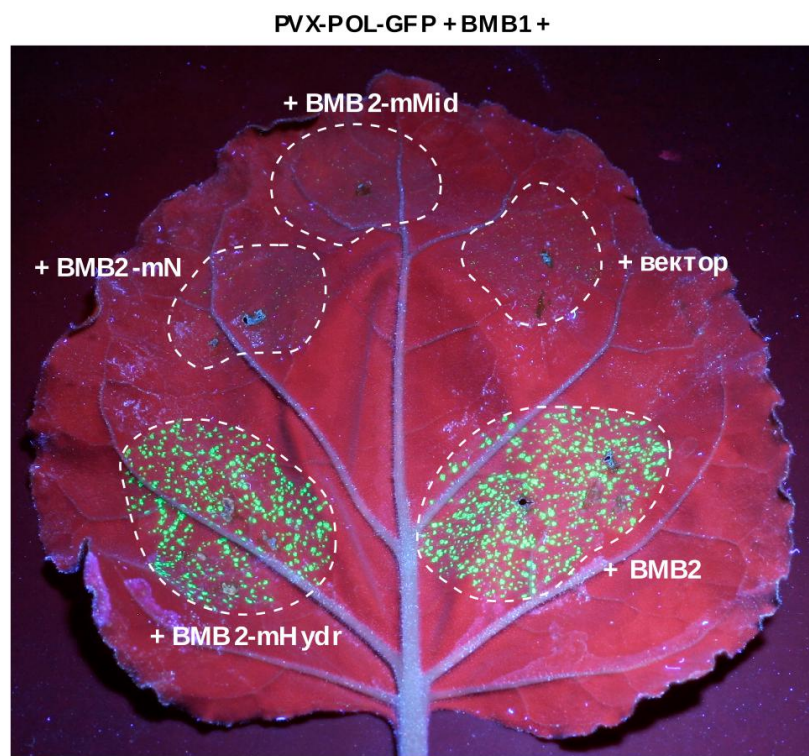


Рисунок 7. Анализ способности мутантов BMB2 поддерживать межклеточный транспорт репортерной конструкции PVX-POL-GFP. Листья *N. benthamiana* были инфильтрированы сильно разведенной суспензией агробактерий, несущих конструкцию PVX-POL-GFP и суспензиями агробактерий, несущих конструкции для экспрессии BMB1, и с одним из вариантов BMB2: BMB2 дикого типа (положительный контроль), BMB2-mN, BMB2-mHydr, BMB2-mMid или пустым вектором (отрицательный контроль). Изображение листа было получено с использованием УФ-лампы на 5 дни. Пунктирными линиями обозначены границы зон инфильтрации.

Для проверки способности мутантов BMB2 направлять внутриклеточный транспорт BMB1 полученные мутантные белки были коэкспрессированы с GFP-BMB1 в клетках *N. benthamiana*. Из всех мутантов только BMB2-Hydr сохранял способность направлять GFP-BMB1 в PAMBs, чего не наблюдалось в случае BMB2-mMid и BMB2-mN (Рис. 8).

Таким образом, консервативные цистеины в MBD1, замененные в мутанте BMB2-mHydr, не являются необходимыми для образования PAMBs и способности BMB2 направлять BMB1 в эти PAMBs, а также не являются необходимыми для обеспечения межклеточного транспорта. Тот факт, что мутант BMB2-mMid теряет способность направлять GFP-BMB1 в PAMBs (Рис. 8E) и поддерживать транспорт PVX-POL-GFP при коэкспрессии с BMB1 (Рис. 7), вероятно, объясняется его выведением из функционального пула в нефизиологические цитоплазматические агрегаты (Рис. 7C). Однако, это не исключает возможности того, что центральные области белка BMB2 дикого типа могут участвовать во взаимодействии с BMB1.

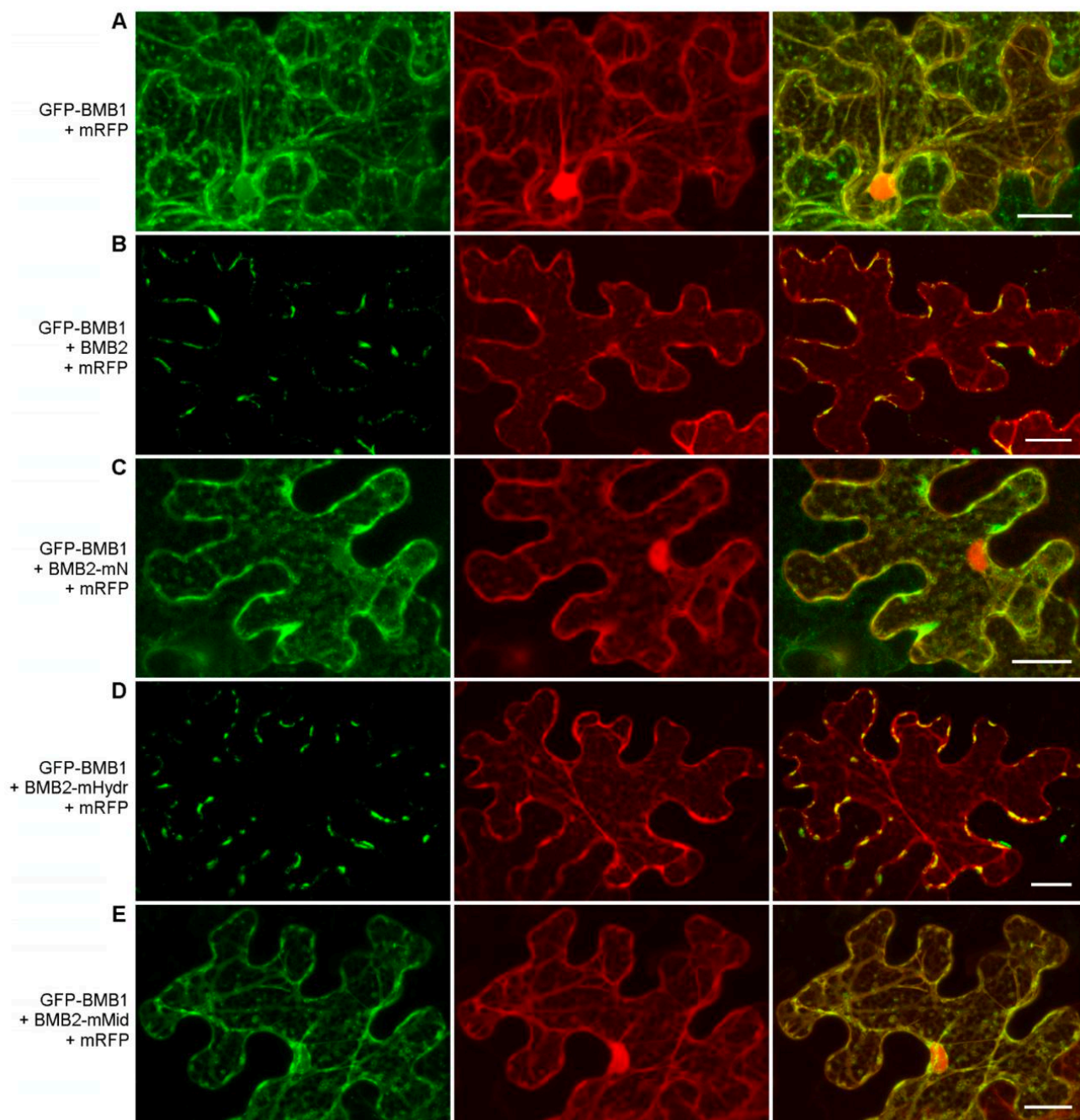


Рисунок 8. Анализ способности мутантов BMB2 направлять GFP-BMB1 в PAMBs. Коэкспрессия GFP-BMB1 с mRFP, и либо с мутантами BMB2 (С–Е), либо с BMB2 дикого типа (В). (А) отрицательный контроль – коэкспрессия GFP-BMB1 с mRFP. Левые панели соответствуют каналу GFP, центральные панели — каналу mRFP, а правые панели — наложению изображений для каналов GFP и mRFP. Масштабная линейка: 20 мкм.

Неспособность мутанта BMB2-mN направлять GFP-BMB1 в периферические тельца (Рис. 8С) согласуется с неспособностью этого мутанта функционировать в тесте по комплементации PVX-POL-GFP (Рис. 7). Тот факт, что BMB2-mN при этом способен образовывать типичные для белка дикого типа PAMBs (Рис. 7В), говорит о сохранении

им части функций BMB2, но не способности взаимодействовать с BMB1, что предполагает участие N-концевого района BMB2 во взаимодействии с BMB1.

1.5. Верификация данных мутационного анализа с помощью FRET-FLIM

Для дополнительной проверки данных об участии С-концевого района BMB1 и N-концевого района BMB2 во взаимодействии двух белков мы провели FRET-FLIM-анализ взаимодействия белков, мутантных по соответствующим областям. Для этого листья *N. benthamiana* были агроинфильтрованы для экспрессии GFP-BMB1d22 с BMB2-mRFP или GFP-BMB1 с BMB2-mN-mRFP. Также GFP-BMB1 был коэкспрессирован с BMB2-mRFP (положительный контроль) или с BMB2 (контроль без акцептора). В случае мутантных белков время жизни флуоресценции в РАМВs не отличалось от отрицательного контроля, в то время как время жизни флуоресценции GFP в положительном контроле радикально снижалось (Рис. 9). Таким образом, данные FRET-FLIM подтверждают, что взаимодействие BMB1 и BMB2 белков происходит при участии С-концевого района BMB1 и N-концевого района BMB2.

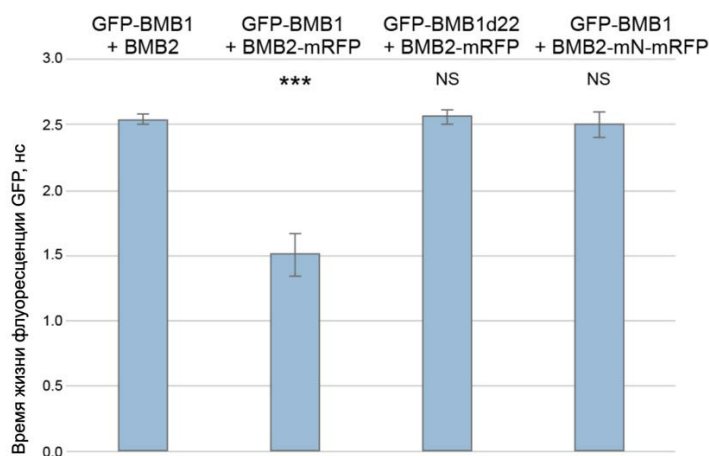


Рисунок 9. FRET-FLIM анализ участия С-концевого района BMB1 и N-концевого района BMB2 во взаимодействии двух белков. Анализ проводился в листьях *N. benthamiana*, агроинфильтрованных для экспрессии указанных сверху от гистограммы пар белков. Столбцы гистограммы обозначают среднее время жизни флуоресценции в наносекундах, планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Над столбцами гистограммы указана достоверность различий по сравнению с отрицательным контролем GFP-BMB1 + BMB2. Звездочками отмечены статистически значимые различия (***, $p < 0,001$), NS — статистически незначимо ($p \geq 0,05$) согласно t-критерию Стьюдента.

1.6. Имитация комплекса BMB1-BMB2

Конструкция для экспрессии слитного белка BMB1-BMB2, в котором BMB2 ковалентно пришит к С-концу BMB1, была получена с целью проверки, будет ли обладать

ли такой слитный белок теми же свойствами, что и комплекс взаимодействующих белков ВМВ1 и ВМВ2. Такой слитный белок не проявил способности комплементировать транспорт в экспериментах с PVX-POL-GFP (Рис. 10А). Так как ВМВ1 и ВМВ2 кодируются в геноме как отдельные белки, можно предположить, что помимо комплекса ВМВ1-ВМВ2, для обеспечения транспорта может требоваться наличие свободного ВМВ1 и/или ВМВ2 белка. Исходя из этих соображений, были проведены эксперименты по комплементации транспорта, где вместе со слитным белком ВМВ1-ВМВ2 коэкспрессировался либо белок ВМВ1, либо белок ВМВ2. Согласно результатам такого теста, помимо комплекса ВМВ1-ВМВ2 для обеспечения межклеточного транспорта репортерной конструкции PVX-POL-GFP требовался дополнительно экспрессированный ВМВ2, но не ВМВ1 (Рис. 10 А). Следует отметить, что участки листьев, инфильтрированные для совместной экспрессии ВМВ1-ВМВ2 и ВМВ1, демонстрировали увядание на 5 дни, что затрудняло визуализацию.

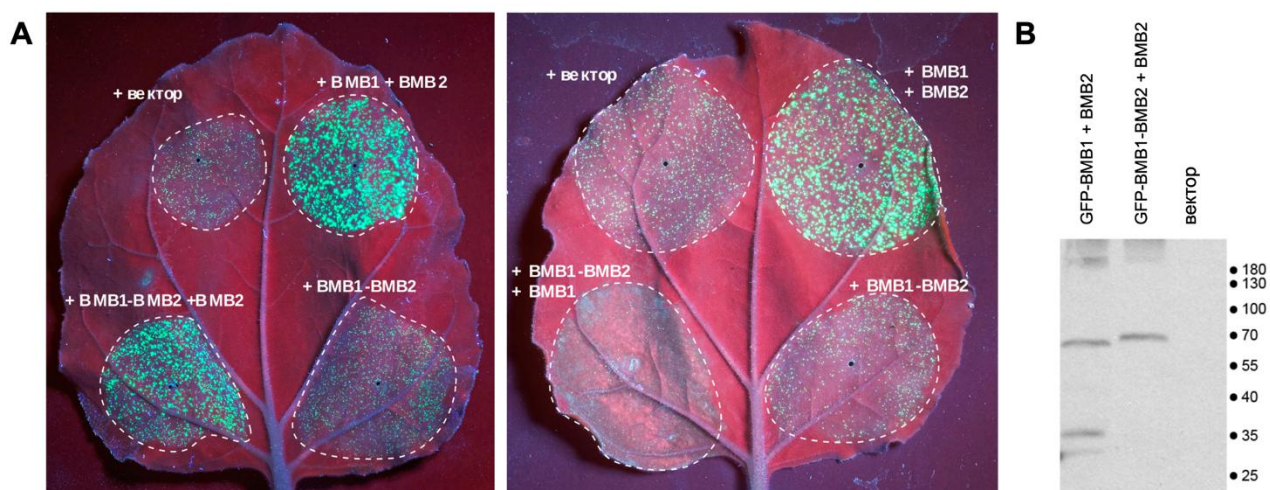


Рисунок 10. Имитация комплекса ВМВ1-ВМВ2. (А) Анализ способности слитного белка ВМВ1-ВМВ2 комплементировать транспорт. PVX-POL-GFP коэкспрессировался с ВМВ1 и ВМВ2 (положительный контроль); с слитным белком ВМВ1-ВМВ2; пустым вектором (отрицательный контроль); а также либо с ВМВ1-ВМВ2 и ВМВ2 (слева), либо ВМВ1-ВМВ2 с ВМВ1(справа). Визуализацию проводили под УФ-лампой на 5 дни. Пунктирные линии соответствуют границам инфильтрированных областей. (В) Вестерн-блот анализ стабильности белка GFP-ВМВ1-ВМВ2 в листьях *N. benthamiana*, агроинфильтрированных для совместной экспрессии GFP-ВМВ1-ВМВ2 и ВМВ2 с использованием GFP-специфических антител. В контрольных образцах листа были агроинфильтрированы для экспрессии либо GFP-ВМВ1 и ВМВ2, либо пустого вектора. Положения маркеров молекулярной массы (в кДа) показаны справа.

Вестерн блот с антителами, специфичными к GFP был проведен для проверки стабильности экспрессируемого в листьях *N. benthamiana* слитного белка GFP-ВМВ1-

ВМВ2. Слитный белок GFP-ВМВ1-ВМВ2 детектировался в виде полосы, соответствующей молекулярной массе слитного полипептида (Рис. 10В).

Таким образом, слитный белок ВМВ1-ВМВ2 сам по себе не может комплементировать транспорт репортерной конструкции PVX-POL-GFP, но при коэкспрессии слитного белка с ВМВ2 они обретают способность комплементировать транспорт.

При анализе субклеточной локализации GFP-ВМВ1-ВМВ2 белок локализовался в множественных мелких тельцах в цитоплазме, что сильно отличалось как от локализации ВМВ1, так и ВМВ2 белка (Рис. 11А).

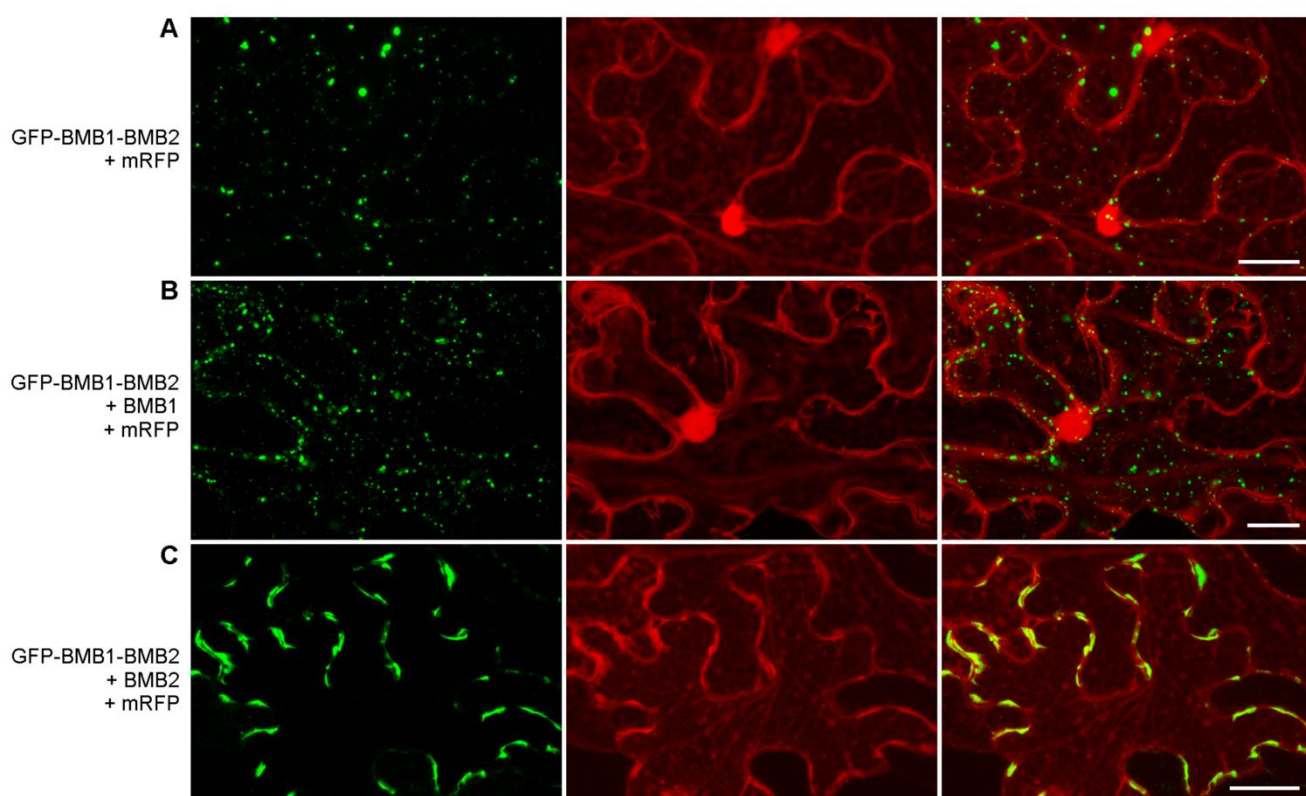


Рисунок 11. Анализ субклеточной локализации слитного белка ВМВ1-ВМВ2. GFP-ВМВ1-ВМВ2 экспрессировался совместно с mRFP, используемым для визуализации границ клетки (А), и либо с ВМВ2 (С), либо с ВМВ1. Левые панели — канал GFP. Центральные панели — канал mRFP. Правые панели — наложение изображений для каналов GFP и mRFP. Масштабная линейка, 20 мкм.

Коэкспрессия слитного белка GFP-ВМВ1-ВМВ2 с ВМВ1 не влияла на локализацию комплекса, в то время как коэкспрессия с ВМВ2 приводила к тому, что GFP-ВМВ1-ВМВ2 локализовался в типичных для ВМВ2 РАМВs (Рис. 11 В,С). Это подтверждает данные, полученные в тестах по комплементации, и свидетельствуют о том, что ВМВ2 может взаимодействовать со слитным белком GFP-ВМВ1-ВМВ2 и направлять его в РАМВs.

Таким образом, направляемый ВМВ2 транспорт ВМВ1 в РАМBs, требует специфического взаимодействия между двумя белками и необходим для обеспечения транспортной функции. Это взаимодействие включает С-концевой район ВМВ1 и N-концевой район ВМВ2. ВМВ1 локализуется в цитоплазме и ядре, в то время как ВМВ2 ассоциирован с мембранами ЭПР и, как предполагается, транспортируется путем транслокации вдоль кортикальных трубочек ЭПР к ПД для образования РАМBs (Lazareva et al., 2017a). На основании этого можно предположить, что ВМВ1 взаимодействует с ВМВ2 при котрансляционной интеграции ВМВ2 в мембрану ЭПР, позволяя ВМВ1 доставляться к ПД в составе комплекса ВМВ1-ВМВ2.

2. Исследование структуры периферических мембранных телец, образование которых индуцируется белком ВМВ2

2.1. Анализ локализации ВМВ1 и ВМВ2 в составе РАМBs, а также в ассоциированных с ними ПД

Учитывая, что для белка ВМВ2 показана способность увеличивать ППС ПД, которая коррелирует с его ретикулон-подобными свойствами, кажется логичным предположить, что эта способность может быть связана с модификацией десмотрубочки в составе ПД (Lazareva et al., 2021a). Учитывая также тот факт, что ВМВ2 направляет транспорт ВМВ1 сначала в РАМBs, а потом и в соседние клетки, было принято решение изучить локализацию ВМВ1 и ВМВ2 в составе РАМBs, а также в составе ПД, ассоциированных с РАМBs с использованием метода иммуноцитохимии. В первой серии экспериментов, растения *N. benthamiana* агроинфилтрировали для экспрессии ВМВ2 слитного с mRFP, и отобранные на 3 дни пробы подготавливали для иммуноцитологического исследования. Локализацию слитного белка анализировали с помощью антител, специфичных к mRFP и вторичных антител, конъюгированных с 12 нм коллоидным золотом. Частицы золота обнаруживались равномерно распределёнными по всему РАМB и в незначительном количестве могли быть обнаружены в ассоциации с другими частями клеток. Исследование прилегающих к РАМBs ПД не выявило золотых частиц внутри каналов ПД (Рис. 12А, В). Однако в некоторых случаях частицы золота были обнаружены непосредственно у входа ПД (Рис. 12С).

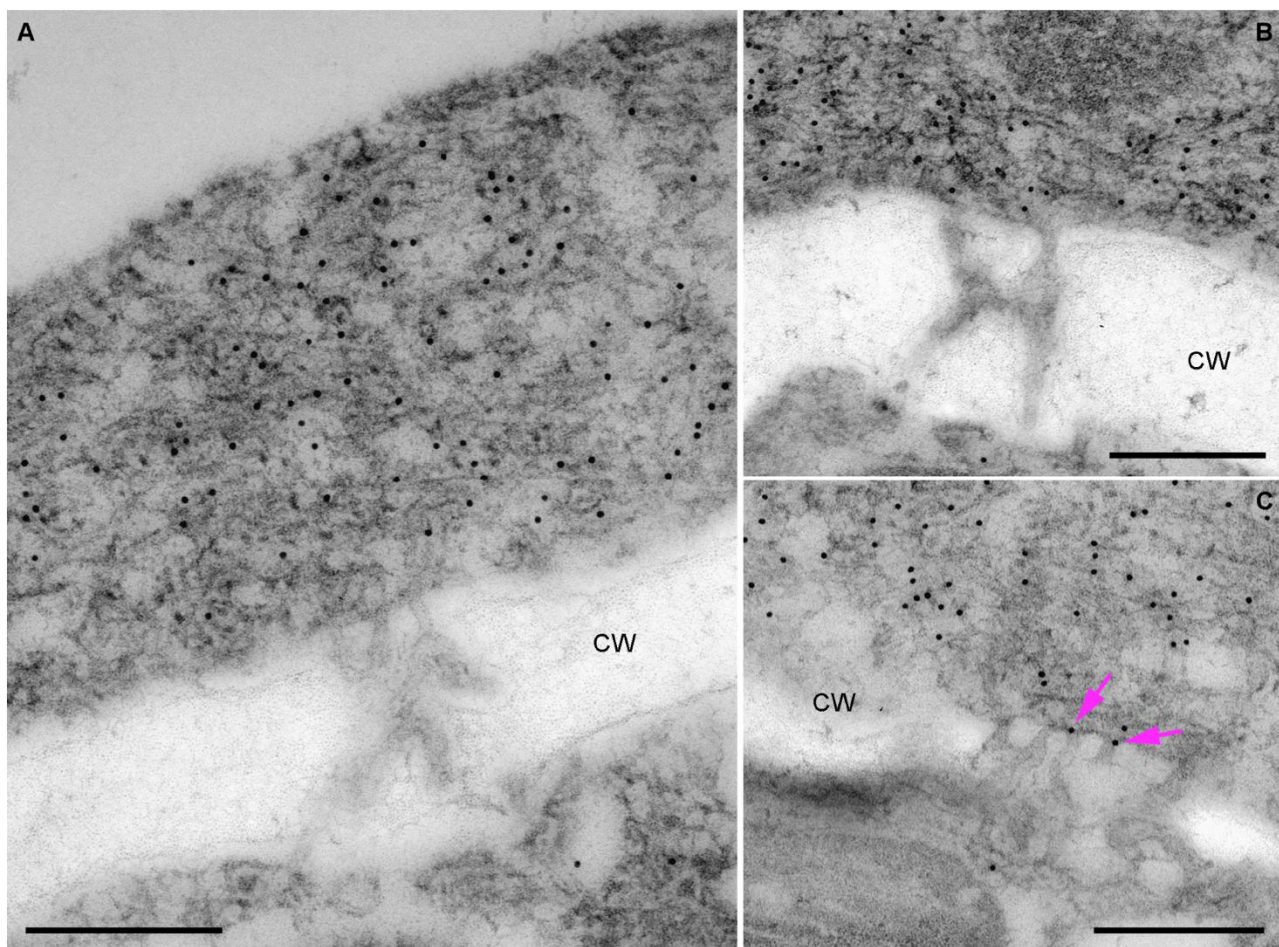


Рисунок 12. Изучение локализации BMB2, слитого с mRFP в PAMBs, методом иммунозолотого мечения. (А, В) Локализация слитного белка в PAMB. (С) Локализация слитного белка непосредственно у устьев ПД обозначена розовыми стрелками. CW — клеточная стенка. Масштабные линейки: 300 нм.

Ядерно-цитоплазматический белок BMB1 в присутствии BMB2 направляется в периферические тельца, образованные BMB2. Поэтому в другой серии экспериментов мы анализировали методом иммуноцитохимии локализацию BMB1 в составе PAMBs. Листья *N. benthamiana* были агроинфильтрованы для совместной экспрессии GFP-BMB1 и BMB2. Образцы были подготовлены аналогично тому, как было описано в выше для BMB2, за исключением использования GFP-специфичных антител вместо mRFP-специфичных. Частицы золота визуализировались равномерно распределенными по всей структуре PAMB, также, как это было показано для BMB2 (Рис. 13А). Золотые частицы иногда могли быть обнаружены в устьях ПД, а также, в нескольких случаях, были обнаружены внутри клеточной стенки, вероятно, в каналах ПД, однако качество визуализации этих срезов не позволяет однозначно это утверждать (Рис. 13В). Надо

отметить, что только в 2 из 18 исследованных ПД были обнаружены частицы золота внутри предполагаемых каналов ПД (Рис. 13 С,D). И хотя в целом факт обнаружения GFP-ВМВ1 в ПД, согласуется с предыдущими данными, о том, что GFP-ВМВ1, совместно экспрессируемый с ВМВ2, колокализуется с каллозой, ассоциированной с ПД (Lazareva et al., 2017), тем не менее частота обнаружения GFP-ВМВ1 в ПД в проведенных нами экспериментах методом иммуноцитохимии, представляется нам крайне низкой и не вполне соответствующей данным конфокальной флуоресцентной микроскопии. Можно предположить, что метод обработки срезов тканей, необходимый для данного исследования, не в полной мере совместим с мечением внутренних структур ПД, которые являются структурой тонкой организации и могут плохо сохраняться в условиях подобной обработки. И хотя иммуноцитохимическое исследование локализации ВМВ1 и ВМВ2 в целом подтверждает данные, полученные с помощью конфокальной микроскопии (Lazareva et al., 2017), тем не менее на основании этих данных, к сожалению, нельзя сделать однозначный вывод относительно локализации этих белков в каналах ПД.

Таким образом, проведенные иммуноцитохимические исследования подтверждают локализацию обоих белков в РАМВs, а также у устьев ПД. В данных исследованиях ВМВ1, но не ВМВ2, обнаруживался непосредственно в каналах ПД. Тем не менее, локализация ВМВ1 в каналах ПД была обнаружена только в 11% всех исследованных ПД. Такой результат оказался сильно ниже ожидаемого, учитывая, что данные конфокальной микроскопии свидетельствуют о колокации ВМВ1 с каллозой в ПД и о транспорте ВМВ1 в соседние клетки (Lazareva et al., 2017). Тем не менее, ограниченные данные иммунозолотого мечения согласуются с моделью, постулирующей, что в присутствии ВМВ2, белок ВМВ1 направляется сначала в ВМВ2-содержащие РАМВs, а затем может транспортироваться в соседние клетки.

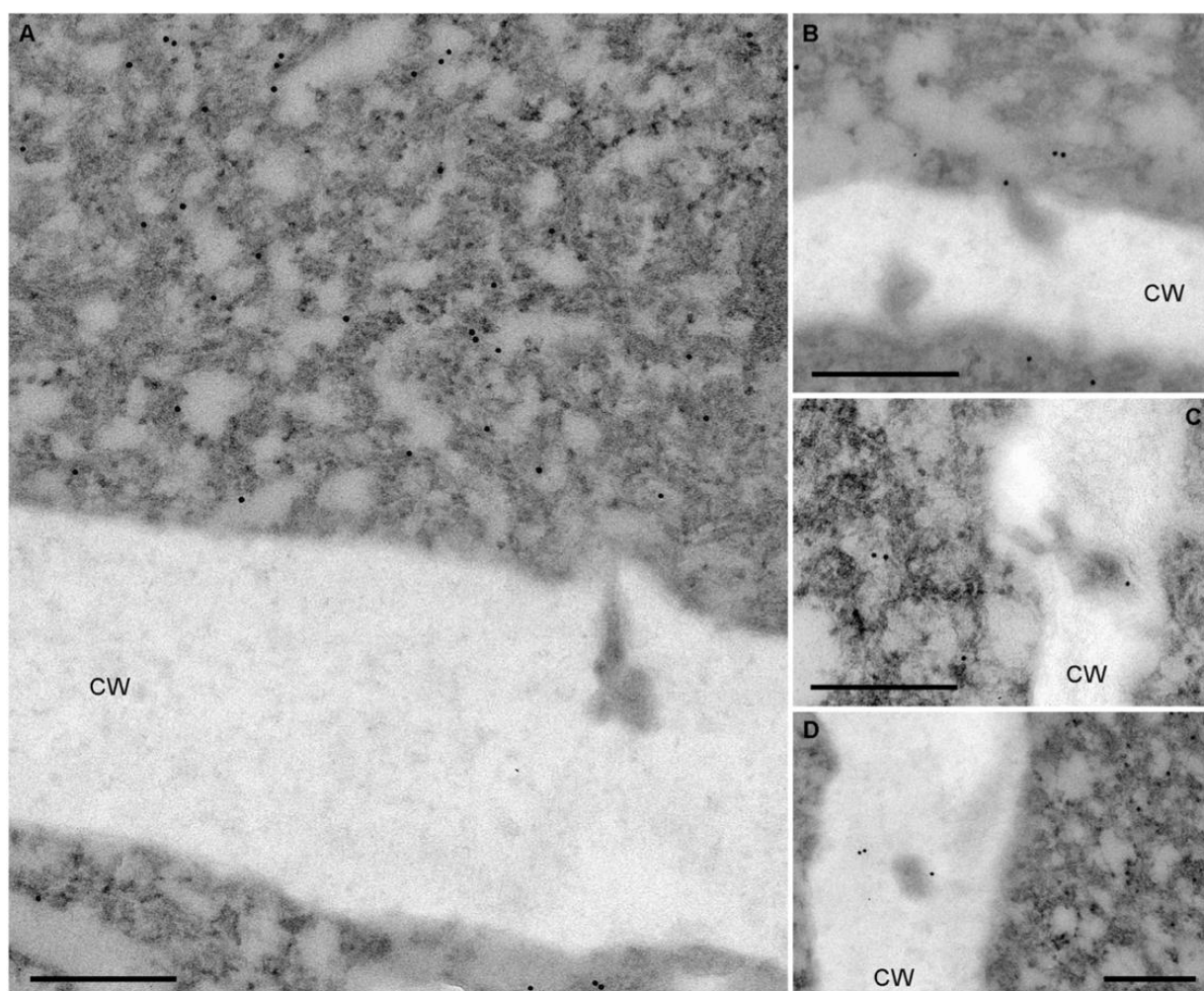


Рисунок 13. Иммунозолотое мечение GFP-BMB1 в клетках *N. benthamiana*, коэкспрессирующих GFP-BMB1 и BMB2. (A) Локализация GFP-BMB1 в РАМВ. (B) Локализация GFP-BMB1 у входа в ПД. (C,D) Золотое мечение в клеточной стенке, вероятно, связанное с каналами ПД. CW — клеточная стенка. Масштабные линейки, 300 нм.

2.2. Изучение ультраструктуры РАМВs в режиме AiryScan

Для детализации структуры РАМВs, наблюдаемых при временной экспрессии белка BMB2 слитного с mRFP, листья растений *N. benthamiana* агроинфицированные для экспрессии BMB2-mRFP, анализировались с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в режиме сверхвысокого разрешения AiryScan. Полученные изображения продемонстрировали, что образованные BMB2 РАМВs представляют собой сильно конденсированные сетчатые структуры (Рис. 14 А,В). Учитывая, что для BMB2 показана ассоциация с ЭПР, внутренние структуры РАМВs, вероятно, могут представлять собой модифицированные трубочки ЭПР, однако разрешение этого метода микроскопии недостаточно для установления тонких деталей структуры РАМВs.

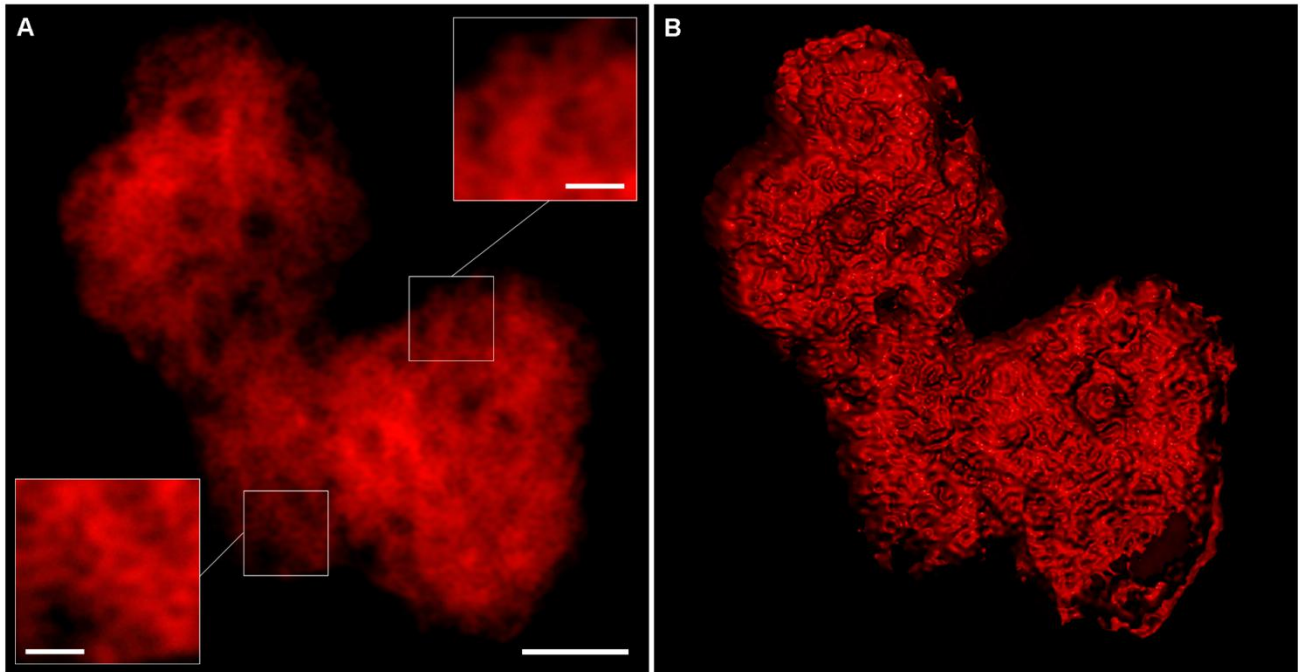


Рисунок 14. Изображения, полученные при конфокальной микроскопии РАМВs в режиме сверхвысокого разрешения AiryScan в эпидермальной клетке *N. benthamiana*, экспрессирующей ВМВ2, слитный с mRFP. (А) Отдельный оптический срез. В белых рамках представлены увеличенные области изображения с более высокой яркостью. (В) Трехмерная реконструкция на основе шести последовательных оптических срезов. Масштабная линейка, 2 мкм. Масштабные линейки для увеличенных областей, 500 нм.

2.3. Изучение ультраструктуры РАМВs с помощью ТЭМ

Далее ультраструктура РАМВs была исследована с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Листья *N. benthamiana* были агроинфицированы для экспрессии ВМВ2 или же пустого вектора, в качестве отрицательного контроля. Анализ срезов растительной ткани показал, что в отличие от отрицательного контроля, где тонкий слой кортикальной цитоплазмы содержал лишь небольшое количество трубочек ЭПР, периферическая цитоплазма в клетках, экспрессирующих ВМВ2, имела расширенные области, содержащие РАМВs, образованные сетью происходящих из ЭПР мембран, выглядевших на тонких срезах как трубочки (Рис. 15А). Согласно измерениям, проведенным на этих изображениях, средняя ширина напоминающих трубочки мембранных структур в составе РАМВs составляла $44,95 \pm 19,3$ нм, что не показывает статистически значимой разницы со средней шириной трубочек ЭПР в контрольных клетках, которая была определена как $37,6 \pm 10,3$ нм. Таким образом, данные ТЭМ указывают на то, что образованные белком ВМВ2 мембранные структуры, происходящие

из ЭПР, в целом, имеют ширину, сопоставимую с трубочками немодифицированного ЭПР.

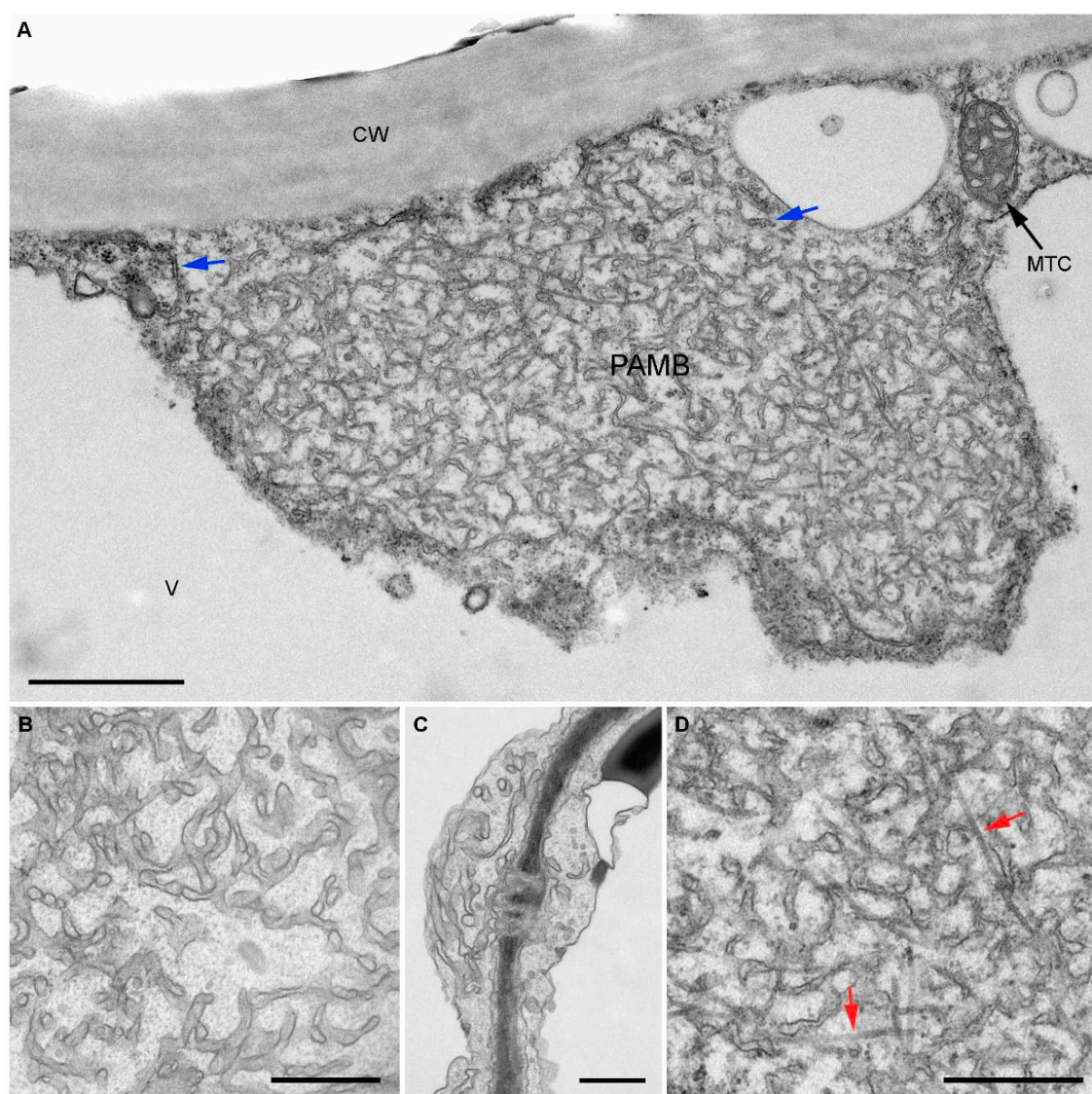


Рисунок 15. Трансмиссионная электронная микроскопия RAMBs. (A) Общий вид RAMB у клеточной стенки. (B) Модифицированные трубочки ЭПР в RAMB. (C) Связь трубочек ЭПР RAMB с десмотрубочками ПД. (D) МТ визуализированные в RAMB. Масштабные линейки: 1 мкм в (A), 500 нм в (B–D). Синие стрелки указывают на гранулярный ЭПР; красные стрелки указывают на МТ. CW — клеточная стенка; V — вакуоль; МТС — митохондрия.

На электронно-микроскопических фотографиях видно, что мембраны в RAMBs не образуют каких-либо упорядоченных структур, могут разветвляться и находятся на разном расстоянии друг от друга, а также имеют переменный диаметр (Рис. 15А, В). В них лишь иногда обнаруживаются рибосомы, хотя RAMBs граничат с шероховатым ЭПР

и, возможно, соединяются с ним. Стоит отметить, что на полученных снимках четко визуализировалось продолжение и соединение модифицированных мембран в РАМВs с десмотрубочками ПД (Рис. 15С). В некоторых случаях внутри РАМВs были обнаружены микротрубочки, однако, их расположение не было упорядоченным и встречалось лишь в нескольких из рассматриваемых РАМВs, так что кажется маловероятным, что микротрубочки могут образовывать основу для формирования РАМВs (Рис. 15D). Органеллы периферической цитоплазмы никогда не обнаруживались внутри РАМВs и были отеснены на их периферию (Рисенек 14А), что позволяет предположить, что РАМВs представляют собой единые, непроницаемые структуры.

2.4. Изучение ультраструктуры РАМВs с помощью электронной томографии

Данные, полученные методом ТЭМ, не отражают реальную пространственную трехмерную структуру внутри клетки, поэтому для определения архитектуры РАМВs мы использовали метод двухосевой электронной томографии на срезах толщиной 200 нм, залитых эпоксидной смолой с золотыми фидуциальными маркерами. Полученная томограмма имеет размер пикселя в плоскости XY 0.97 нм и толщину среза 1.87 нм. Для оценки пространственного расположения мембран в РАМВs мы построили 3D-модель на основе данных электронно-микроскопической томографии. Так как современное программное обеспечение не позволяет корректно произвести автоматическую трассировку столь сложно организованной мембранной структуры, была проведена ручная трассировка мембран РАМВs, плазматической мембраны и неопознанной везикулярной структуры на последовательных срезах. На основании обработанных данных была сгенерирована 3D-модель участка РАМВ с помощью программного обеспечения для трехмерного моделирования биологических объектов. Полученная 3D-реконструкция продемонстрировала, что мембранный компартмент, образованный белком ВМВ2 из мембран ЭПР, представляет собой извилистую непрерывную мембранную систему (Рис. 16). Стоит отметить, что трубочки составляют меньшую часть среди структур в РАМВ, а подавляющее большинство представляют собой извилистые цистерны разных форм и размеров (Рис. 16). Таким образом, те мембранные структуры РАМВ, которые ранее на снимках ТЭМ были приняты за трубочки, скорее всего, соответствуют поперечным сечениям извилистых цистерн, образованных из ЭПР.

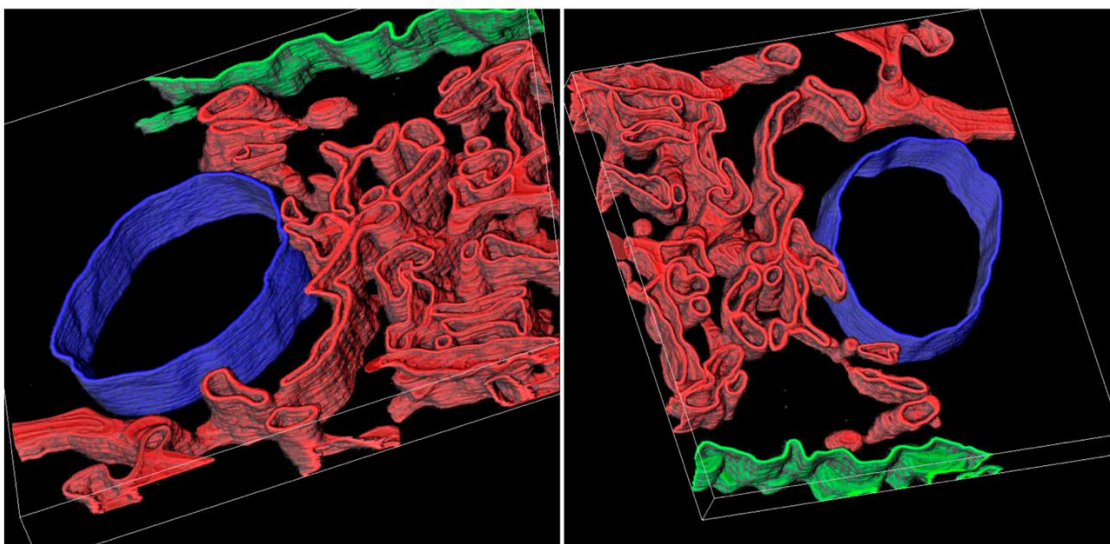


Рисунок 16. Трехмерная реконструкция фрагмента РАМВ на основе данных томографии. Показаны две проекции полученной 3D-реконструкции. Красным цветом обозначены производные мембран ЭПР, зеленым — плазматическая мембрана, а синим — мембрана вакуоли. Размер модели $1500 \times 1300 \times 150$ нм.

В предыдущих исследованиях было выявлено, что РАМВs, образование которых индуцируется белком ВМВ2, состоят из мембран, происходящих из ЭПР, а также была показана способность ВМВ2 вызывать сужения трубочек ЭПР (Lazareva et al., 2017; Lazareva et al., 2021b; Lazareva et al., 2021a). Исходя из этих фактов можно было бы ожидать, что РАМВs образуются из суженных трубочек ЭПР, однако данные ТЭМ не выявили сужения ширины трубочек ЭПР в составе РАМВs, более того, большая часть мембран в РАМВs представляла собой извилистые цистерны, а не трубочки. Так как предполагается, что, по аналогии с РАМВs, образуемыми при инфекции РVХ, индуцированные белком ВМВ2 РАМВs скорее всего тоже являются ассоциированными с ПД ВРК, то наблюдаемое превращение трубочек ЭПР в цистерны в составе РАМВs кажется вполне оправданным, так как подобная архитектура значительно увеличивает площадь поверхности мембран в составе ВРК, необходимую для эффективной репликации вируса, происходящей в ассоциации с мембранами.

2.5. Межмембранные контакты внутри РАМВs

При детальном изучении отдельных изображений РАМВ, полученных с помощью электронной томографии, было отмечено, что во многих местах мембранные структуры локально сближаются и никакого видимого зазора между двумя контактирующими мембранами не обнаруживается (Рис. 17А). Морфологически такие межмембранные

контакты в РАМВs можно было разделить на два типа: локальные «точечные» контакты и протяженные, длина которых достигала 200 нм (Рис. 17В). Однако, при изучении последовательных срезов тех участков структуры, где визуализировались «точечные» межмембранные контакты, оказалось, что такие контакты могут тянуться на протяжении целой серии последовательных срезов и иметь длину по крайней мере 190 нм (Рис. 17D). Таким образом, «точечные» контакты, скорее всего, представляют собой лишь поперечные сечения протяженных контактов. На серии последовательных срезов «точечный» контакт (который на самом деле является поперечной проекцией протяженного), может быть преобразован в протяженный, что подчеркивает извилистость цистерн в составе РАМВs.

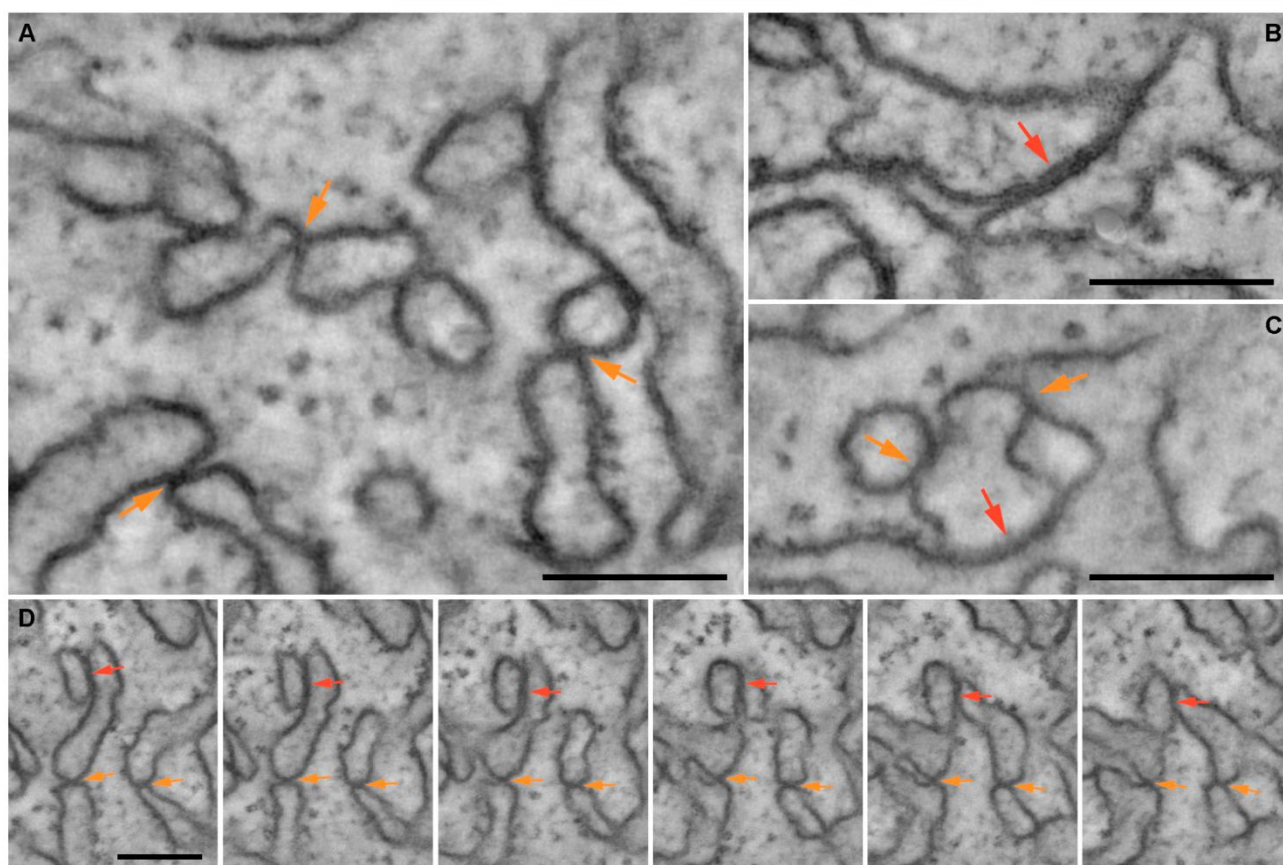


Рисунок 17. Изображения межмембранных контактов в РАМВs, полученные с помощью электронной томографии. (А–С) Разнообразие межмембранных контактов в РАМВ. (D) Серия срезов РАМВ, сделанных с шагом 18,8 нм, демонстрирующая межмембранные контакты, сохраняющиеся на протяжении серии последовательных срезов. Оранжевые стрелки указывают на «точечные» межмембранные контакты, а красные стрелки - на протяженные межмембранные контакты. Масштабная линейка, 150 нм.

В результате анализа полученных в ходе электронной томографии изображений мы выделили три группы межмембранных контактов на основании степени кривизны

мембран, которые их образуют. В первую группу вошли межмембранные контакты между двумя изогнутыми краями цистерн, во вторую – контакты между краем цистерны и мембраной с низкой кривизной, а в третью – контакты между двумя мембранами с низкой кривизной. Из 438 контактов, исследованных на изображениях электронной томографии, 50,9% составляли контакты типа 1 между двумя изогнутыми краями цистерн. Всего доля контактов с участием одного или двух изогнутых краев цистерн (типы 1 и 2) составляла 77,4%.

Таким образом, данные электронной томографии демонстрируют, что мембранные структуры в РАМВs, представляющие собой преимущественно цистерны, взаимосвязаны многочисленными протяженными межмембранными контактами, где две мембраны очень близко подходят друг к другу, но не сливаются. Такие структуры напоминают МК, где мембраны двух органелл взаимодействуют посредством специфических для МК белков, локально связывающих две мембраны (Pérez-Sancho et al., 2016). И хотя в литературе встречаются сообщения о гомотипических МК, например, между двумя пероксисомами или двумя липидными каплями, однако, не удалось найти литературных данных о МК между элементами ЭПР (Scorrano et al., 2019). Таким образом, появление таких специфических межмембранных контактов в РАМВs, вероятно, является результатом экспрессии ВМВ2. Интересно, что в случае специфических для РАМВs межмембранных контактов не наблюдается видимого расстояния между двумя мембранами, тогда как типичные МК между ЭПР и другими органеллами характеризуются зазором порядка 15–20 нм (Pérez-Sancho et al., 2016), что указывает на структурное различие между специфическими для РАМВs межмембранными контактами и известными МК. Так как РАМВs содержат множество таких контактов, и, вполне вероятно, что цистерны ЭПР в РАМВs могут быть тесно взаимосвязаны этими контактами, возможно, что именно межмембранные контакты определяют структуру РАМВs и удерживают ее как единое целое.

Как было отмечено, в образовании межмембранных контактов в РАМВs участвуют в основном края цистерн, но не их плоские поверхности. Ранее было показано, что в клетках, где сеть кортикальных трубочек ЭПР искусственно преобразована в цистерны, ВМВ2 локализуется преимущественно по краям цистерн, имея сродство к сильно изогнутым мембранам (Lazareva et al., 2021a). Исходя из этого, можно предположить, что

молекулы BMB2 располагаются на краях двух цистерн и взаимодействуя, отвечают за образование специфических для PAMBs межмембранных контактов.

2.6. Изучение способности BMB2 к олигомеризации

Подобная природа образования межмембранных контактов в составе PAMBs кажется весьма вероятной, учитывая, что BMB2 обладает ретикулон-подобными свойствами, а функция ретикулонов, как известно, зависит от их способности олигомеризоваться внутри липидного бислоя, вызывая его искривление (Lazareva et al., 2021a; Shibata et al., 2008). Поэтому была исследована способность BMB2 к олигомеризации. С использованием метода FRET-FLIM были проанализированы листья растений *N. benthamiana*, агроинфильтрированные для совместной экспрессии BMB2-GFP либо с BMB2-mRFP, либо с нативным BMB2 (отрицательный контроль без акцептора). Время жизни флуоресценции GFP измерялось в PAMBs. Время жизни флуоресценции GFP, измеренное при совместной экспрессии BMB2-GFP с BMB2-mRFP составило 0,74 нс, что значительно меньше, чем при совместной экспрессии BMB2-GFP с BMB2, составляющее 2,47 нс (Рис. 18А). Такое изменение времени жизни флуоресценции соответствует необычайно высокой эффективности FRET 69,8%. Таким образом, данные FRET-FLIM свидетельствуют о взаимодействии BMB2-GFP и BMB2-mRFP в PAMBs и подтверждают гипотезу об олигомеризации BMB2.

Для дополнительного подтверждения данных об олигомеризации BMB2 был использован метод химического «сшивания» белковых молекул. Из листьев растений *N. benthamiana*, агроинфильтрированных для экспрессии BMB2, слитного с mRFP, была выделена фракция клеточных мембран, которую обрабатывали бифункциональным сшивающим агентом этиленгликоль-бис(сукцинимидилсукцинатом) (EGS), содержащим две аминореактивные NHS-эфирные группы, разделенные 12-атомным линкером. Методом вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к mRFP, было показано, что в необработанных кросслинкером образцах, слитный с mRFP белок BMB2 детектируется в виде единичной полосы, с подвижностью в районе 37 кДа, что соответствует мономерному белку. В обработанных кросслинкером образцах, слитный с mRFP белок BMB2 детектировался в виде полосы с молекулярной массой более 180 кДа (Рис. 18В). Таким образом, белок BMB2 способен образовывать высокомолекулярные комплексы, вероятно, благодаря способности BMB2 к олигомеризации. Мы попытались

детектировать димеры ВМВ2 или какие-либо другие комплексы промежуточного размера используя обработку мембранной фракции возрастающими концентрациями кросслинкера. На изображениях, полученных с помощью Вестерн-блота, видно, что никакие промежуточные комплексы не детектируются даже при минимальных концентрациях кросслинкера (Рис. 18С). Эти данные свидетельствуют о том, что образование комплексов, содержащих ВМВ2, может быть высококооперативным процессом.

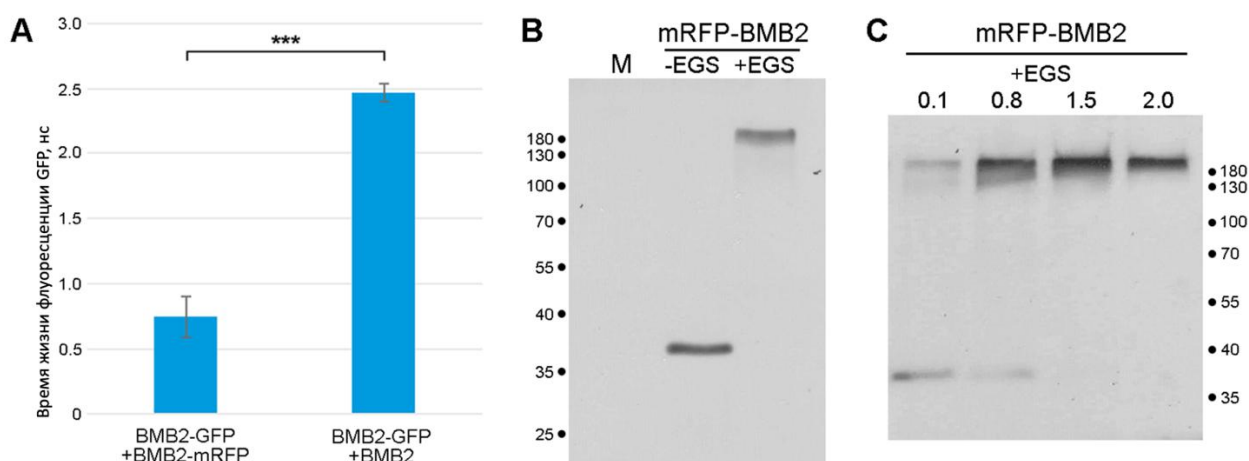


Рисунок 18. Анализ способности ВМВ2 к олигомеризации. (А) FRET-FLIM анализ самовзаимодействия ВМВ2 в клетках растений *N. benthamiana*, агроинфильтрированных для экспрессии ВМВ2-GFP совместно либо с ВМВ2-mRFP, либо с ВМВ2. Показаны средние времена жизни флуоресценции (нс); планки погрешностей отражают стандартное отклонение. Звездочками отмечены статистически значимые различия ($p < 0,001$) согласно t-критерию Стьюдента. (В) Анализ сшивания кросслинкером EGS белковых комплексов, образованных ВМВ2. Мембранная фракция, выделенная из листьев, агроинфильтрированных для экспрессии ВМВ2 слитного с mRFP, была проанализирована методом вестерн-блоттинга после обработки кросслинкером EGS или без нее. М — образец неинфильтрированного листа. (С) Сшивание EGS, выполненное при четырех возрастающих концентрациях, как указано над дорожками (мМ). Маркеры молекулярной массы белков указаны в кДа.

Надо отметить, что данная картина сильно отличается от данных, полученных для ретикулонов, которые в аналогичных экспериментах образуют «лестницу» из сшитых полос, соответствующих димерам и олигомерам различного порядка, что указывает на низкую, в сравнении с ВМВ2, кооперативность взаимодействия между молекулами ретикулона (Shibata et al., 2008).

Тот факт, что индуцированные белком ВМВ2 РАМВs образованы сложной сетью трубочек и цистерн, соединенных большим количеством протяженных межмембранных контактов, образуемых, в основном, краями цистерн, нежели чем их плоскими

поверхностями, предполагает роль ВМВ2, обладающего ретикулон-подобными свойствами и располагающегося на краях цистерн в этом процессе. На основании имеющихся данных, можно предположить, что индуцируемое ВМВ2 образование РАМВs может происходить в два этапа. Первоначальная интеграция ВМВ2 в мембрану ЭПР может вызывать сужения трубочек ЭПР. Далее, олигомеризация ВМВ2 может приводить к реорганизации модифицированных трубочек ЭПР в цистерны, в которых ВМВ2 смещен на края цистерн с высокой степенью кривизны мембраны. Не исключено, что такая реорганизация может происходить вследствие рекрутирования клеточных факторов. Для многих вирусов растений показано взаимодействие и привлечение в места образования ВРК белков-формообразователей ЭПР, таких как ретикулоны (BMV, TuMV, BBSV) и атластины (TuMV) (Laliberté, Zheng, 2014) . Для флавивирусов животных, которые вызывают реорганизацию клеточного ЭПР в структуры, имеющие сходство со структурой цистерн в образуемых ВМВ2 РАМВs, показано участие белков LNP для образования ВРК (Tran et al., 2021). Известно, что в растениях *Arabidopsis* белки LNP отвечают за образование цистерн (Kriechbaumer et al., 2018). Более того, AtLNP1 и 2 взаимодействуют с ретикулонами и действуют согласованно для образования и поддержания соотношения цистерн и трубочек, при этом белки LNP индуцируют образование плоских участков цистерн, тогда как ретикулоны, локализующиеся на краю цистерн (Sparkes et al., 2010), индуцируют искривление, тем самым ограничивая расширение цистерн. Не исключено, что ВМВ2, обладающий ретикулон-подобными свойствами может привлекать белки LNP для образования цистерн в составе РАМВs по аналогичному механизму.

В совокупности данные о тонкой структуре РАМВs, образование которых индуцируется белком ВМВ2, дают новое понимание реорганизации клеточных мембран вирусными белками. Данные о преимущественной организации мембран в РАМВs в форме цистерн и наличии межмембранных контактов в них открывают новые направления для будущих исследований механизма ВМВ-опосредованного межклеточного транспорта вируса, такие как характеристика молекулярного состава специфических для РАМВs межмембранных контактов и анализ механизма преобразования кортикальных трубочек ЭПР в РАМВ-специфические структуры.

3. Изучение защитного ответа, вызываемого белком ВМВ1 в растениях *N.*

benthamiana

3.1. Характеристика защитного ответа, который ВМВ1 вызывает в растениях *N. benthamiana*

Ранее при изучении взаимодействия ВМВ1 и ВМВ2 было отмечено, что листья растений *N. benthamiana*, агроинфильтрированные для экспрессии ВМВ1, подвержены увяданию и некротизации в местах инфильтрации на 4-5 день (Рис. 19 А). Подобная реакция развивается при гиперчувствительном ответе (hypersensitive response, HR) растения – локальном иммунном ответе, характеризующимся быстрой гибелью клеток. Подобной картины не наблюдалось в областях инфильтрации, где в качестве отрицательного контроля были инфильтрированы агробактериальные культуры, несущие пустой вектор (Рис. 19А).

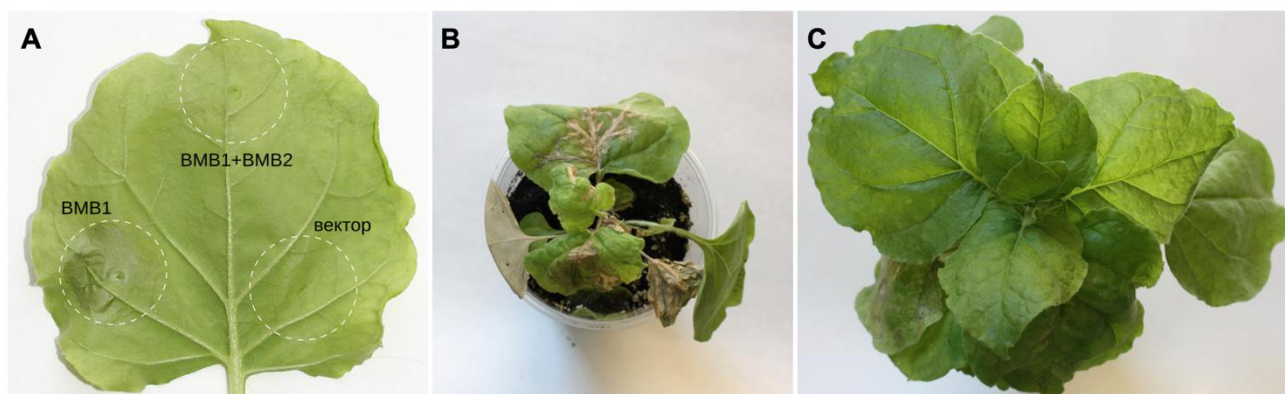


Рисунок 19. ВМВ1 вызывает защитный ответ в растениях *N. benthamiana*. (А) напоминающий HR защитный ответ в зоне листа, агроинфильтрированной для экспрессии ВМВ1 в сравнении с зоной, агроинфильтрированной для коэкспрессии ВМВ1 и ВМВ2. Агроинфильтрация бактериями, несущими пустой вектор была использована в качестве контроля. Фотография сделана на 5 дни. (В,С) Растения *N. benthamiana*, зараженные TRV-ВМВ1 (В) или пустым вектором (С) на 11 дни.

Для того, чтобы убедиться, что индуцируемая ВМВ1 HR-подобная реакция развивается не только в условиях временной экспрессии при агробактериальной трансформации, мы также экспрессировали ВМВ1 в контексте вирусной инфекции, для чего использовали вектор на основе генома вируса погремковости табака (tobacco rattle virus, TRV) (MacFarlane, Popovich, 2000). Растения, зараженные TRV-ВМВ1 в сравнении с растениями, зараженными пустым TRV-вектором, демонстрировали напоминающий HR фенотип как в инокулированных, так и в системно-инфицированных листьях, проявляющийся в форме увядания и отмирания ткани листа в местах выхода вируса из

флоэмы в верхних листьях (Рис. 19 E,F). Таким образом, индуцированный ВМВ1 защитный ответ не зависит от метода экспрессии ВМВ1 и проявляется как при агроинфильтрации, так и при экспрессии в контексте вирусной инфекции.

Для того, чтобы охарактеризовать вызываемый экспрессией ВМВ1 защитный ответ растения, листья, агроинфильтрированные для экспрессии ВМВ1, окрашивались с применением гистохимического метода детекции активных форм кислорода с помощью 3,3'-диаминобензидина (DAB). В присутствии перекиси водорода DAB окисляется с образованием коричневого осадка, что позволяет судить о накоплении АФК в тканях листа. Окрашивание с помощью DAB привело к образованию коричневого окрашивания в областях листа, экспрессирующих ВМВ1, но не наблюдалось в областях отрицательного контроля, агроинфильтрированных пустым вектором (Рис. 20А). Для того, чтобы идентифицировать, сопровождается ли экспрессия ВМВ1 индукцией отложения каллозы в клеточных стенках, часто происходящей при защитном ответе растений, использовали окрашивание анилиновым синим - флуоресцентным красителем, который специфически окрашивает каллозу. Как было визуализировано с помощью лазерной конфокальной микроскопии, специфический флуоресцентный сигнал в клеточной стенке был значительно ярче в областях, экспрессирующих ВМВ1 по сравнению с контролем (Рис. 20В, С). Количественный обсчет специфического сигнала, соответствующего отложениям каллозы в клеточной стенке, продемонстрировал различие с контролем в 2,5 раза (Рис. 20D). Также с помощью обратной транскрипции и количественной ПЦР была проведена оценка уровня экспрессии 9-липоксигеназы (9-lipoxygenase, 9-LOX), участвующей в биосинтезе оксипинонов, которая позитивно регулирует программируемую клеточную гибель, индуцированную вирусной инфекцией и уровень экспрессии которой обычно повышается во время вирусной инфекции (García-Marcos et al., 2013). Согласно данным количественной ПЦР, экспрессия ВМВ1 в 3,7 раза увеличивала уровень накопления мРНК 9-LOX в сравнении с контролем (Рис. 20E). Все эти данные свидетельствуют о том, что экспрессия ВМВ1 в растениях *N. benthamiana* индуцирует защитный ответ, сопровождающийся накоплением АФК, отложением каллозы и повышением экспрессии 9-LOX.

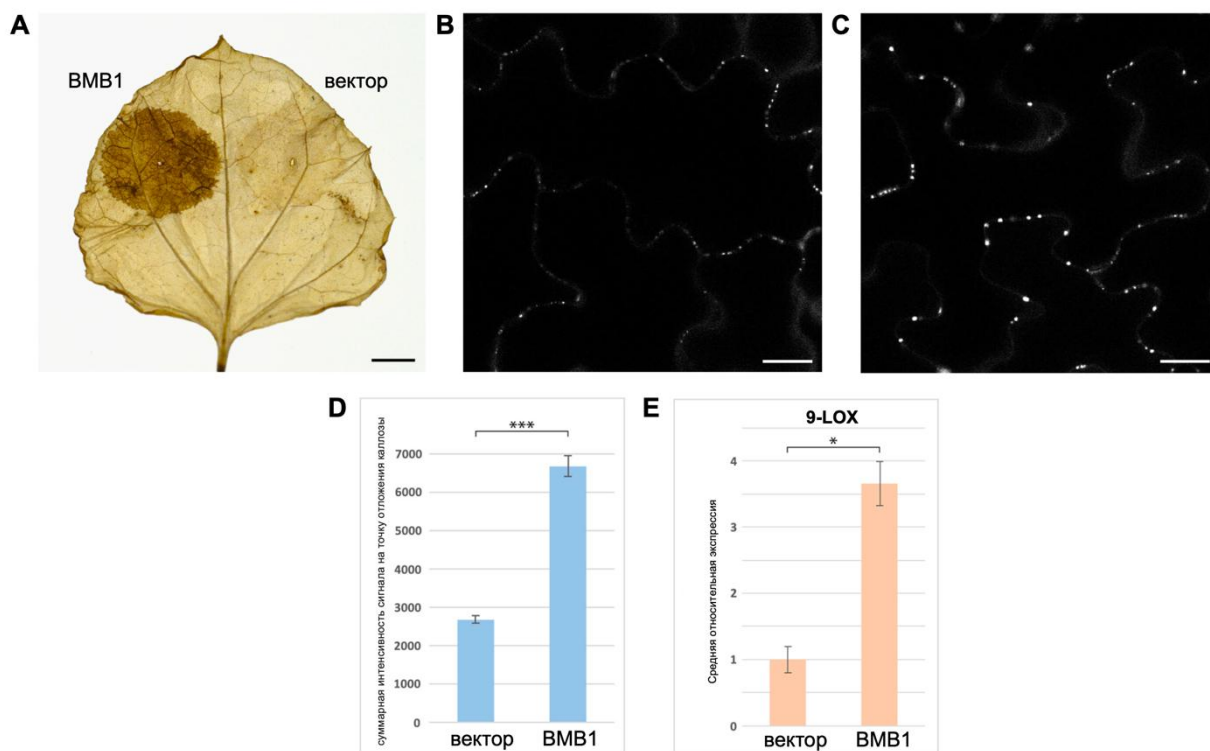


Рисунок 20. Анализ защитного ответа, вызванного BMB1 (A) Накопление АФК в листьях *N. benthamiana*, агроинфильтрированных для экспрессии BMB1. Окрашивание с помощью DAB было выполнено на 2 дни. Масштабная линейка 1 см. (B,C) Окрашивание отложений каллозы с помощью анилинового синего в листьях *N. benthamiana*, инфильтрированных для экспрессии BMB1 (C) или пустого вектора (B) на 2 дни. Масштабная линейка 20 μm . (D) количественная оценка данных окрашивания отложения каллозы. Показаны средние значения суммарной интенсивности сигнала, посчитанные на основании данных, полученных для индивидуальных точек отложения каллозы, планки погрешностей отражают стандартную ошибку. Было измерено более 500 индивидуальных точек отложения каллозы, для каждой из агроинфильтрированных областей на 5 листьях. Звездочки обозначают статистическую значимость (***, $p < 0.001$) в соответствии с t-критерием Стьюдента. (E) уровень экспрессии 9-LOX в листьях, агроинфильтрированных для экспрессии BMB1 или пустого вектора. Образцы были отобраны на 2 дни. Средние уровни экспрессии определялись с помощью количественной ПЦР. Планки погрешностей отражают стандартную ошибку. Были проанализированы по 10 биологических повторностей. Звездочки обозначают статистическую значимость (*, $p < 0.5$) в соответствии с t-критерием Стьюдента.

Таким образом, при характеристике иммунного ответа растения на вирусный ТБ BMB1 было обнаружено, что временная экспрессия этого белка путем агроинфильтрации приводит к индукции защитного ответа растения и, следовательно, не требует вирусной инфекции, вирусной дцРНК или других вирусных факторов. Защитный ответ, вызванный экспрессией BMB1, имеет сходство с HR и приводит к образованию некроза, однако, механизм возникновения HR-подобной реакции, индуцированной BMB1, все же

отличается от HR, который возникает вследствие специфического распознавания фактора авирулентности патогена в растениях, несущих соответствующий ген устойчивости (Cui et al., 2015). Так, агроинfiltrация для экспрессии фактора авирулентности p50 TMV, приводит к быстрому и сильному HR в растениях табака, несущих ген устойчивости N, вызывая гибель областей инfiltrации на листе уже в течение 36–48 часов (Solovieva et al., 2013). В противоположность этому, в аналогичной экспериментальной системе экспрессия ВМВ1 не вызывает гибель растительной ткани в областях инfiltrации вплоть до 4-5 дня после инfiltrации. Как было показано, на более ранних этапах защитный ответ, индуцированный ВМВ1, сопровождается отложением каллозы в клеточной стенке, которое направлено на ограничение межклеточного транспорта вируса. HR-подобная реакция возникает лишь на 4-5 день, что вероятно, может быть связано с достижением уровня накопления ВМВ1 некоего порогового значения. TGB1 PVX, отдаленно родственной белку ВМВ1, как известно, также может вызывать HR-подобную реакцию в растениях *N. benthamiana*, когда количество TGB1 в растительных клетках достигает порогового уровня (Aguilar et al., 2015). Таким образом и в случае TGB1 PVX, и, вероятно, в случае ВМВ1, этот эффект является дозозависимым. Еще одно сходство в характере иммунного ответа, вызываемого этими двумя вирусными ТБ - повышение экспрессии 9-LOX, гена пути биосинтеза оксипинов, который положительно регулирует запрограммированную гибель клеток при вирусной инфекции (García-Marcos et al., 2013). Активируемый 9-LOX биосинтез оксипинов запускает сигнальные пути, приводящие как к формированию локального иммунного ответа, так и к системной приобретенной устойчивости (Vicente et al., 2012). В частности, оксипины, образующиеся под действием 9-LOX могут индуцировать синтез брассиностероидов, приводящий к индукции отложения каллозы в клеточной стенке и ограничению распространения патогенов (Marcos et al., 2015). Этот механизм также может лежать в основе наблюдаемого при экспрессии ВМВ1 отложения каллозы. Надо отметить, что возможно вовлечение и других механизмов, приводящих к отложению каллозы при экспрессии ВМВ1, так как при индукции защитного ответа в растениях, как правило, запускается множество параллельных сигнальных путей, но приводящих к ограниченному набору консервативных защитных реакций, таких как отложение каллозы в клеточной стенке.

3.2. ВМВ2 супрессирует защитный ответ, индуцированный ВМВ1

В стандартных экспериментах по комплементации транспорта, которые проводились ранее с использованием репортерной конструкции PVX-POL-GFP, агробактериальные культуры для экспрессии ВМВ1 и ВМВ2 смешивались в соотношении 1:1 (Lazareva et al., 2017). Изменение этого соотношения, как оказалось, влияет на эффективность вирусного транспорта. При смешивании агробактериальных культур для экспрессии ВМВ1 и ВМВ2 в соотношении 10:1, размер флуоресцентных локусов инфекции, отражающий эффективность вирусного транспорта, значительно уменьшался по сравнению с размером локусов при соотношении ВМВ1:ВМВ2 равном 1:1 (Рис. 21А). При использовании соотношения ВМВ1:ВМВ2 соответствующему 1:10 размер локусов был, наоборот, значительно больше по сравнению со стандартным соотношением 1:1 (Рис. 21В). Учитывая, тот факт, что ВМВ1 способен вызывать защитный ответ, кажется вполне закономерным, что подавление транспорта, наблюдаемое при более высоких уровнях экспрессии ВМВ1, может быть связано с более сильной защитной реакцией, индуцированной ВМВ1, сопровождающейся отложением каллозы и ограничивающей межклеточный транспорт вируса. С другой стороны, усиление транспорта вируса, наблюдаемое при высоких уровнях экспрессии ВМВ2, вероятно, связано со способностью ВМВ2 увеличивать ППС ПД. Кроме того, мы предположили, что повышение эффективности транспорта в случае повышенной экспрессии ВМВ2 может быть также связано со способностью ВМВ2 подавлять защитный ответ растения на ВМВ1. Для проверки этой гипотезы листья *N. benthamiana* были агроинфильтрованы для совместной экспрессии ВМВ1 и ВМВ2. Оказалось, что при коэкспрессии двух белков на 5 дни не наблюдалось увядания и некротизации инфицированных областей, которые обычно обнаруживаются в этой временной точке при экспрессии ВМВ1 (Рис. 19А). Чтобы удостовериться, что этот фенотипический эффект связан с подавлением защитной реакции растения, мы сравнивали уровни накопления каллозы в клеточной стенке в областях, инфицированных для совместной экспрессии ВМВ1 и ВМВ2, с областями, инфицированными для экспрессии ВМВ1 с пустым вектором. Количественная оценка данных окрашивания каллозы показала, что уровень накопления каллозы значительно снижался при совместной экспрессии ВМВ1 с ВМВ2 и был сопоставим с таковым в областях, агроинфицированных пустым вектором в качестве отрицательного контроля, что свидетельствует о способности ВМВ2 подавлять защитный ответ растения,

индуцированный ВМВ1. На следующем этапе мы проверили, может ли этот эффект объясняться направлением ВМВ1 в образованные ВМВ2 РАМВs при коэкспрессии белков, для этого был использован мутант ВМВ2-mutN, несущий аминокислотные замены в N-концевой области ВМВ2 и неспособный взаимодействовать с ВМВ1 и направлять его в РАМВs. Количественный анализ данных по окрашиванию каллозы, в листьях, агроинфильтрированных для коэкспрессии ВМВ1 и ВМВ2-mutN, выявил, что уровень отложения каллозы в данном случае был выше по сравнению с коэкспрессией ВМВ1 и ВМВ2 дикого типа, но ниже, чем при коэкспрессии ВМВ1 с пустым вектором (Рис. 21С).



Рисунок 21. ВМВ2 супрессирует защитный ответ индуцированный ВМВ1. (А,В) Соотношение ВМВ1 к ВМВ2 влияет на эффективность транспорта вируса. Листья *N. benthamiana* были агроинфильтрированы для экспрессии репортерной конструкции PVX-POL-GFP совместно с различными соотношениями ВМВ1 к ВМВ2, равными 1:1, 1:10 или 10:1. Визуализацию проводили на 4 дни под УФ-светом. (С) Количественная оценка данных окрашивания отложений каллозы в листьях *N. benthamiana*, агроинфильтрированных для экспрессии ВМВ1, ВМВ1 + ВМВ2 или ВМВ1 + ВМВ2mutN или пустого вектора. Показаны средние значения суммарной интенсивности сигнала, посчитанные на основании данных, полученных для индивидуальных точек отложения каллозы, планки погрешностей отражают стандартную ошибку. Было измерено более 500 индивидуальных точек отложения каллозы, для каждой из областей инфильтрации на пяти агроинфильтрированных листьях. Звездочки обозначают статистическую значимость (***, $p < 0.001$) в соответствии с t-критерием Стьюдента. NS, статистически незначимо ($p > 0,05$).

Эти данные показывают, что взаимодействие белков ВМВ способствует подавлению защитной реакции растения, индуцированной ВМВ1, однако, помимо этого взаимодействия, в ВМВ2-зависимом подавлении индуцированной ВМВ1 реакции, вероятно, могут быть задействованы и другие факторы. Многие ТБ способны снижать уровни отложения каллозы, как это, например, хорошо описано для ТБ TMV, который привлекает β -1,3-глюканазы, гидролизующие каллозу, противодействуя таким образом

отложению каллозы, вызванному инфекцией TMV (EpeI, 2009; Huang et al., 2023). Считается, что одним из способов регуляции ППС ПД является разрушение каллозы у входа в ПД, а учитывая, что для ВМВ2 показана способность увеличивать ППС ПД пока не известным образом, нельзя исключить, что он может, аналогично ТБ TMV, быть способным снижать уровень накопления каллозы, однако это лишь предположение, требующее дальнейших исследований.

4. Изучение субклеточной локализации ВМВ1

4.1. Анализ ядерной локализации ВМВ1

Ранее, при изучении субклеточной локализации белка ВМВ1 и его делеционного мутанта ВМВ1-d22, было обнаружено, что они локализуются в цитоплазме, нуклеоплазме, а также в субъядерных структурах, напоминающих тельца Кахаля, причем подобная субъядерная локализация усилена в случае делеционного мутанта. Для идентификации этих структур мы агроинфильтрировали растения *N. benthamiana* для коэкспрессии GFP-ВМВ1 или GFP-ВМВ1-d22 с фибриларином-2 *A. thaliana*, слитным с mRFP (mRFP-fib2), маркером ядрышка и телец Кахаля. Было обнаружено, что субъядерные тельца ВМВ1 колокализуются с мечеными mRFP-fib2 тельцами Кахаля (Рис. 22 А-С). Кроме того, при коэкспрессии с fib2-mRFP наблюдалась концентрация ВМВ1 и ВМВ1-d22 в ядрышке, чего не наблюдалась в отрицательном контроле при коэкспрессии с mRFP (Рис. 22D). Таким образом, белок ВМВ1 помимо цитоплазматической и ядерной локализации, обнаруживается также в ядрышке и тельцах Кахаля, причем сродство белка к этим структурам увеличивается при удалении С-концевого участка ВМВ1.

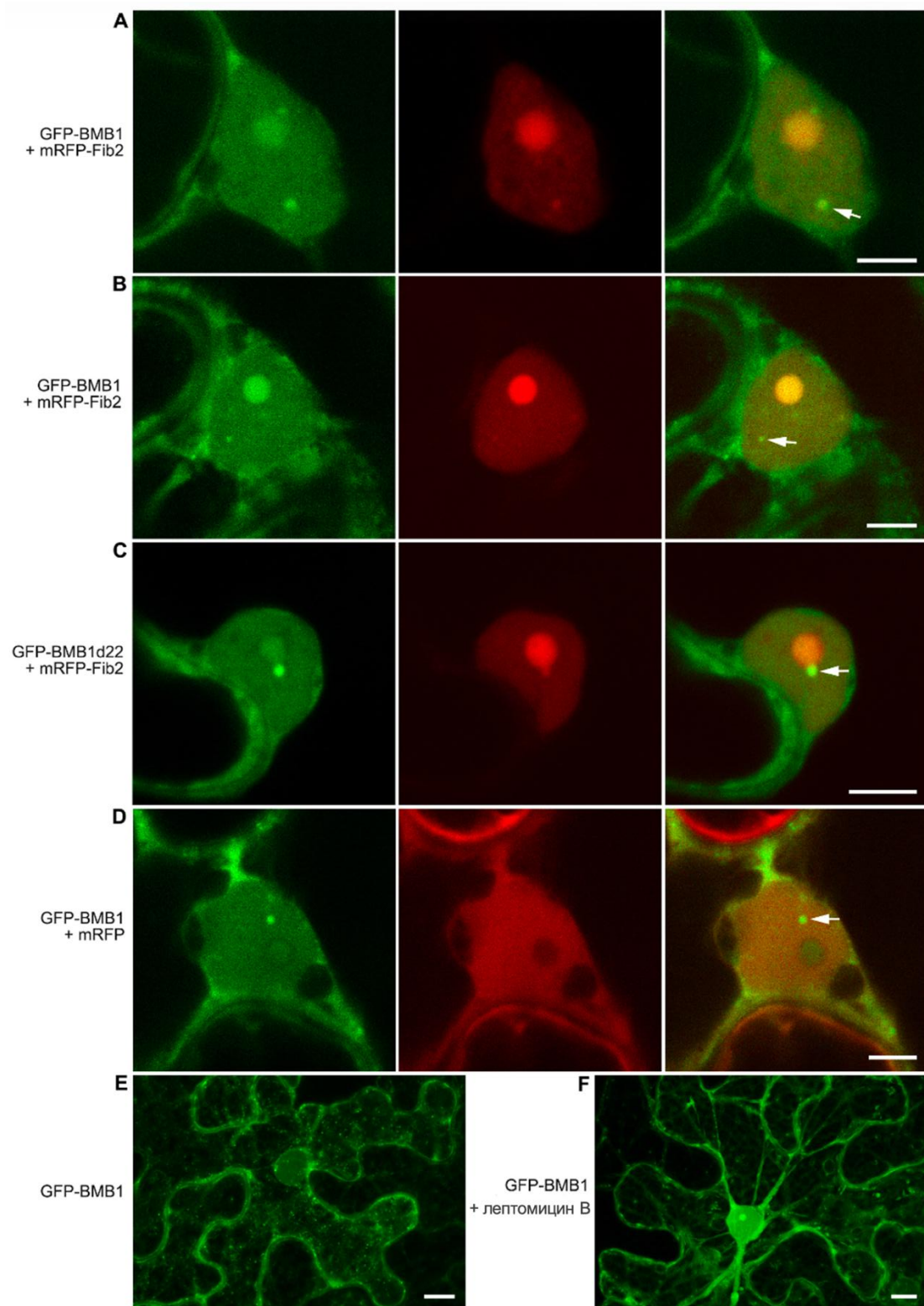


Рисунок 22. Локализация BMB1 в субъядерных структурах. (A,B) Коэкспрессия GFP-BMB1 с mRFP-Fib2. Фенотип накопления GFP-BMB1 в ядрышке варьировался от умеренного (A) до высокого (B). (C) Коэкспрессия GFP-BMB1d22 с mRFP-Fib2 и (D) GFP-BMB1 с mRFP. (E,F) Обработка лептомицином B приводила к повышенному накоплению GFP-BMB1 в ядре и субъядерных структурах (F) по сравнению с необработанной клеткой (E). (A–D) левые панели соответствуют каналу GFP, центральные панели — каналу mRFP, а правые панели — наложению изображений каналов GFP и mRFP. Стрелками обозначены тельца Кахаля. (A–D,F) Масштабная линейка: 5 мкм; (E,F) Масштабная линейка: 10 мкм.

Для установления того, является ли локализация в тельцах Кахаля динамической или статичной, листья, агроинфильтрированные для экспрессии GFP-BMB1 были обработаны лептомицином В, ингибитором CRM1-зависимого ядерного экспорта белков (Nishisi et al., 1994). Анализ с помощью конфокальной сканирующей микроскопии показал, что обработка ингибитором приводила к увеличению количества флуоресцентного сигнала, соответствующего GFP-BMB1 в ядре (Рис. 22 Е). Таким образом, можно заключить, что BMB1 способен не только к ядерному импорту, но и ядерному экспорту, предполагая ядерно-цитоплазматическое перемещение BMB1.

4.2. Поиск сигналов ядерной локализации BMB1

Для того, чтобы понять природу ядерной локализации белка BMB1, был проведен анализ последовательности белка BMB1 с использованием сервисов, предсказывающих потенциальные сигналы ядерной/ядрышковой локализации, включая NetSurfP, PredictProtein, WESA, DeepREx-WS и SVMTriP, однако очевидные сигналы обнаружены не были. Поэтому были предприняты попытки идентифицировать сигналы, отвечающие за ядерную локализацию BMB1 с помощью мутагенеза. С использованием тех же ресурсов были предсказаны области, расположенные на поверхности молекулы белка. В результате были выбраны четыре региона BMB1, соответствующие аминокислотным остаткам 97–102, 111–115, 238–243 и 287–291, для которых было предсказано, что они расположены на поверхности. В каждый из этих регионов были внесены по две точечные замены, в результате чего были получены мутанты BMB1-mut1 (с мутациями K98S, R99G), BMB1-mut2 (S112A, R114S), BMB1-mut3 (K238G, Y240S) и BMB1-mut4 (R287G, K291G).

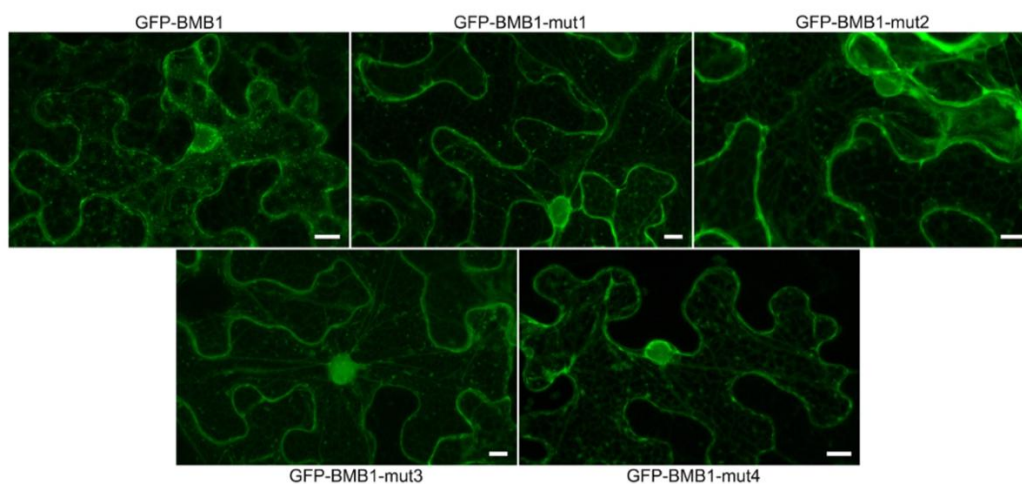


Рисунок 23. Субклеточная локализация слитных с GFP мутантов BMB1 с точечными мутациями в областях, расположенных на поверхности белка, согласно предсказаниям.

С помощью конфокальной сканирующей микроскопии была исследована субклеточная локализация полученных мутантов, слитных с GFP в листьях *N. benthamiana*. Все мутанты сохраняли локализацию, характерную для BMB1 дикого типа и ни одна из введенных мутаций не изменяла динамическое равновесие распределения белка между ядром и цитоплазмой (Рис. 23). Таким образом, сигналы, направляющие ядерный транспорт BMB1, идентифицировать не удалось.

4.3. Анализ BMB1 с искусственно добавленными NES или NLS

Так как не удалось идентифицировать сигналы в последовательности BMB1, ответственные за его ядерную локализацию, мы решили добавить к последовательности BMB1 экзогенные сигналы ядерной локализации (NLS) Т-антигена SV40 (последовательность PKKKRKVEDP) (Kalderon et al., 1984) и сигнала ядерного экспорта (NES) белка-ингибитора цАМФ-зависимой протеинкиназы (последовательность ELALKLAGLDIN) (Wen et al., 1995), для анализа специфических функций белка BMB1 в ядре. В качестве отрицательного контроля использовался FLAG-эпитоп (последовательность DYKDDDDK) (Hopp et al., 1988). Последовательности NLS, NES и FLAG были слиты с N-концом BMB1, чтобы С-конец, необходимый для взаимодействия с BMB2 и межклеточного транспорта оставался интактным. Для анализа субклеточной локализации полученных белков, были также сделаны варианты белков, дополнительно несущие последовательность GFP с N-конца белков. Листья растений *N. benthamiana* были агроинфильтрованы для экспрессии GFP-NLS-BMB1, GFP-NES-BMB1, GFP-FLAG-BMB1, а также GFP-BMB1 в качестве контроля. Как и ожидалось, добавление искусственного сигнала NLS приводило к аккумуляции белка в ядре (Рис. 24В), в то время как добавление контрольной последовательности FLAG не повлияло на локализацию белка (Рис. 24С). Добавление экзогенной последовательности NES, вопреки нашим ожиданиям, не привело к преимущественной локализации белка в цитоплазме (Рис. 24D). Тогда NES ингибитора цАМФ-зависимой протеинкиназы был заменен на NES HIV-1 Rev (LQLPPLERLTL) (Behrens et al., 2017); полученная конструкция была названа GFP-NES2-BMB1. Субклеточная локализация этого белка также была неотличима от GFP-BMB1 (Рис. 24Е). Таким образом, ни одна из последовательностей NES, слитных с BMB1, не приводила к ожидаемому эффекту концентрации белка в цитоплазме. По этой причине в дальнейших экспериментах NES-BMB1 не использовался.

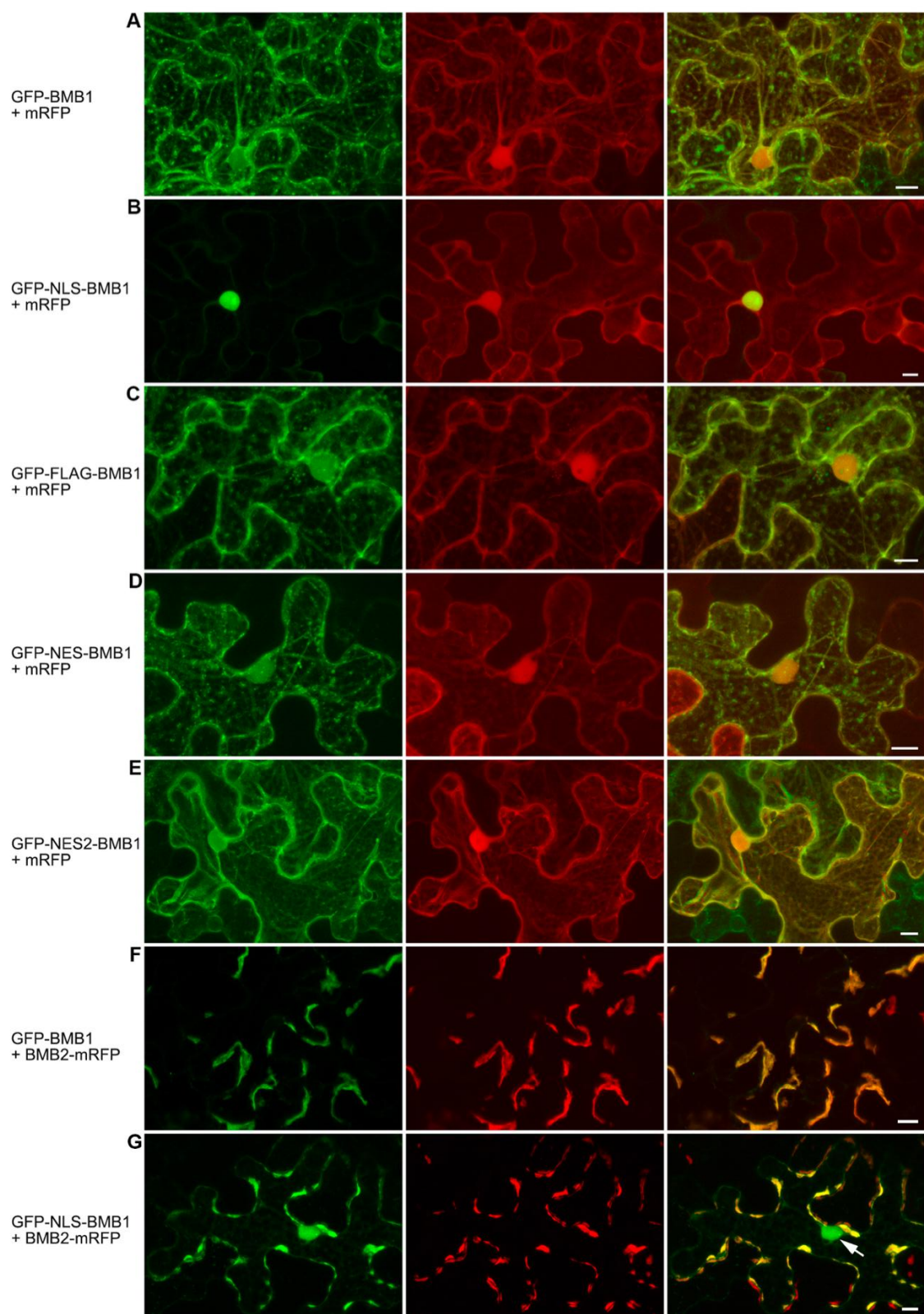


Рисунок 24. Анализ субклеточной локализации BMB1 с искусственно добавленными NLS, NES, NES-2 или FLAG в клетках листьев *N. benthamiana*, агроинфицированных для коэкспрессии mRFP и (A) GFP-BMB1, (B) GFP-NLS-BMB1, (C) GFP-FLAG-BMB1, (D) GFP-NES-BMB1, (E) GFP-NES2-BMB1, а также (F) GFP-BMB1 и BMB2-mRFP и (G) GFP-NLS-BMB1 и BMB2-mRFP. Стрелка указывает на ядро. Левые панели соответствуют каналу GFP, центральные — каналу mRFP, правые панели — наложению изображений для каналов GFP и mRFP. Масштабная линейка: 10 мкм.

Чтобы проанализировать, будет ли концентрация белка ВМВ1 в ядре влиять на опосредованный ВМВ2 транспорт в РАМВs, листья *N. benthamiana* были агроинфильтрованы для совместной экспрессии GFP-NLS-ВМВ1 и ВМВ2-mRFP. Тогда как совместная коэкспрессия GFP-ВМВ1 и ВМВ2-mRFP приводила к тому, что GFP-ВМВ1 полностью колокализовался с РАМВs, образованными ВМВ2-mRFP (Рис. 24 F), GFP-ВМВ1 с искусственно добавленным NLS локализовался как в РАМВs, так и в ядре (Рис. 24G). Таким образом, GFP-NLS-ВМВ1 сохраняет способность направляться в РАМВs, образованные ВМВ2. Для того, чтобы проанализировать, влияет ли повышенная локализация ВМВ1 в ядре на эффективность вирусного транспорта, NLS-ВМВ1 был протестирован в экспериментах по комплементации транспорта репортерной конструкции PVX-POL-GFP. Листья *N. benthamiana* были агроинфильтрованы для экспрессии соответствующих конструкций и анализировались на 5 дни под УФ-светом. Совместная экспрессия PVX-POL-GFP с ВМВ2 и либо с ВМВ1, либо с NLS-ВМВ1, либо с FLAG-ВМВ1 приводила к образованию многоклеточных локусов инфекции (Рис. 25A). Неожиданно, что не только NLS-ВМВ1, но и FLAG-ВМВ1 совместно экспрессированные с ВМВ2 приводили к образованию локусов большего размера, чем в случае белка ВМВ1 дикого типа, однако эффект NLS-ВМВ1 был более выраженным, чем эффект FLAG-ВМВ1 (Рис. 25A). Флуоресцентная микроскопия была проведена для измерения размеров локусов. Данные обмеров подтвердили визуальные наблюдения и выявили статистически значимые различия между размерами локусов, подтвердив, что добавление NLS и FLAG к N-концу ВМВ1 приводит к более эффективному транспорту вируса, причем в случае NLS этот эффект выражен сильнее (Рис. 25B). Учитывая, что добавление не только NLS, но и контрольной последовательности FLAG приводило к усилению межклеточного транспорта, можно предположить, что эти последовательности, добавленные с N-конца белка ингибируют развитие защитной реакции растений на экспрессию ВМВ1. Тогда была проведена оценка защитной реакции на экспрессию ВМВ1, NLS-ВМВ1, FLAG-ВМВ1 или пустого вектора путем количественного определения отложения каллозы в клеточной стенке. Было обнаружено, что и NLS, и FLAG значительно ингибируют защитную реакцию, индуцированную ВМВ1 (Рис. 25C). Важно отметить, что отложение каллозы ингибировалось в одинаковой степени для NLS-ВМВ1 и для FLAG-ВМВ1 (Рис. 25C), хотя размеры локусов инфекции в экспериментах по комплементации транспорта в случае NLS-ВМВ1 были больше, чем наблюдаемые для

FLAG-BMB1 (Рис. 24В). Эти данные позволяют предполагать, что преимущественная ядерная локализация BMB1, вызванная добавлением искусственного NLS, приводит к более эффективному транспорту вируса по сравнению с вариантом BMB1 с искусственно добавленной последовательностью FLAG. Таким образом, с одной стороны - добавление последовательностей NLS и FLAG к N-концу BMB1 подавляет защитный ответ растения, индуцированный BMB1, усиливая транспорт вируса. С другой стороны, преимущественная локализация BMB1 в ядре приводит к дополнительному усилению транспорта вируса, возможно, благодаря взаимодействию с ядерными белками. Таким образом, более эффективный транспорт вируса, наблюдаемый в случае NLS-BMB1, предполагает, что ядерная локализация BMB1 сама по себе является фактором более эффективного транспорта вируса.

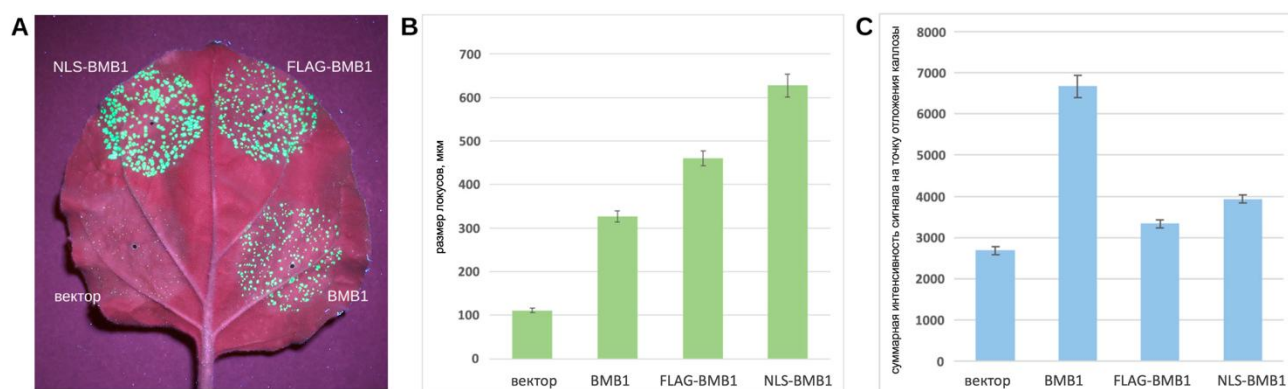


Рисунок 25. Влияние искусственно добавленных к N-концу BMB1, последовательностей NLS и FLAG на функции белка. (А) Влияние NLS и FLAG на межклеточный транспорт вируса. Листья *N. benthamiana* были агроинфильтрированы для совместной экспрессии PVX-POL-GFP и BMB2 с BMB1, FLAG-BMB1, NLS-BMB1 или пустым вектором как указано на рисунке. Фотографии были сделаны под УФ-светом через 4 дни. (В) Количественная оценка диаметра локусов инфекции в эксперименте по комплементации транспорта PVX-POL-GFP. Для расчета каждого среднего значения было измерено не менее 30 локусов на каждом из четырех агроинфильтрированных листьев. Планки погрешностей отражают стандартную ошибку. (С) Количественная оценка данных окрашивания отложений каллозы для областей листьев, агроинфильтрированных для экспрессии BMB1, FLAG-BMB1, NLS-BMB1 или пустого вектора. Для расчета средних значений, представленных на графике, было измерено более 500 отдельных точек отложения каллозы для каждой из областей инфильтрации на пяти агроинфильтрированных листьях. Планки погрешностей отражают стандартную ошибку. Различия между всеми парами значений, представленными на графиках В и С, статистически значимы ($p < 0,001$) в соответствии с t-критерием Стьюдента.

Можно предположить, что локализация BMB1 в ядре является результатом взаимодействия с белком Fib2, с которым они колокализуются в ядре. Такое взаимодействие с Fib2 показано, например, для TGB1 BSMV, а нокдаун гена *fib2*

приводит к ингибированию межклеточного транспорта BSMV (Li et al., 2018). Учитывая отдаленное эволюционное родство белков ВМВ1 и ТГВ1 и предполагаемое сходство механизмов ВМВ- и ТГВ-опосредованного транспорта вирусов (Morozov, Solovyev, 2012), а также тот факт, что ВМВ1 с искусственно добавленным NLS, преимущественно локализованный в ядре, обеспечивает более эффективное перемещение вируса от клетки к клетке, чем ВМВ1 дикого типа, можно предположить, что ядерная локализация ВМВ1 и его предполагаемое взаимодействие с Fib2, аналогичное ТГВ1, могут способствовать ВМВ1-зависимому транспорту вирусов. Кроме того, возможно, что ядерная локализация ВМВ1 необходима для взаимодействия с другими ядерными белками для усиления транспорта через ПД.

Заключение

Экспериментальные данные, полученные в работе, вносят вклад в современные представления о механизмах работы ТБ на примере белков ВМВ1 и ВМВ2, кодируемых бинарным транспортным блоком генов HGSV. Было установлено, что для обеспечения транспортной функции необходимо взаимодействие между белками ВМВ1 и ВМВ2, в котором принимает участие С-концевой район ВМВ1 и N-концевой район ВМВ2. Был идентифицирован новый тип реорганизации клеточных мембран вирусными белками, отличный от описанных ранее для других фитовирусов. С помощью электронной томографии было показано, что мембранные компартменты, образованные вследствие ремоделирования мембран ЭПР вирусным белком ВМВ2, представляют собой сложную сеть из извилистых цистерн. Особенностью таких мембранных компартментов является наличие протяженных ММК между входящими в их состав цистернами, где две мембраны ЭПР сближаются, и видимого зазора между ними не наблюдается. Это морфологически отличает их от хорошо описанных классических мембранных контактов 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 литературы

1. Abas L., Luschnig C. Maximum yields of microsomal-type membranes from small amounts of plant material without requiring ultracentrifugation // *Analytical biochemistry*. 2010. Vol. 401. № 2. P. 217–227.
2. Agaoua A., Bendahmane A., Moquet F., Dogimont C. Membrane trafficking proteins: A new target to identify resistance to viruses in plants // *Plants*. 2021. Vol. 10. № 10. P. 1–12.
3. Agbeci M., Grangeon R., Nelson R.S., Zheng H., Laliberté J.F. Contribution of Host Intracellular Transport Machineries to Intercellular Movement of Turnip Mosaic Virus // *PLOS Pathogens*. 2013. Vol. 9. № 10. P. e1003683.
4. Aguilar E., Almendral D., Allende L., Pacheco R., Chung B.N., Canto T., Tenllado F. The P25 Protein of Potato Virus X (PVX) Is the Main Pathogenicity Determinant Responsible for Systemic Necrosis in PVX-Associated Synergisms // *Journal of Virology*. 2015. Vol. 89. № 4. P. 2090–2103.
5. Amari K., Donato M. Di, Dolja V. V., Heinlein M. Myosins VIII and XI Play Distinct Roles in Reproduction and Transport of Tobacco Mosaic Virus // *PLOS Pathogens*. 2014. Vol. 10. № 10. P. e1004448.
6. Aniento F., Medina Hernández V.S. de, Dagdas Y., Rojas-Pierce M., Russinova E. Molecular mechanisms of endomembrane trafficking in plants Get access // *Plant Cell*. 2022. Vol. 34. № 1. P. 146–173.
7. Ashby J., Boutant E., Seemanpillai M., Sambade A., Ritzenthaler C., Heinlein M. Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Functions as a Structural Microtubule-Associated Protein // *Journal of Virology*. 2006. Vol. 80. № 17. P. 8329–8344.
8. Asurmendi S., Berg R.H., Koo J.C., Beachy R.N. Coat protein regulates formation of replication complexes during tobacco mosaic virus infection // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004. Vol. 101. № 5. P. 1415–1420.
9. Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O. V., Kozlovsky S. V., Poljakov V.Y. The movement protein-triggered in situ conversion of potato virus X virion RNA from a nontranslatable into a translatable form // *Virology*. 2000. Vol. 271. № 2. P. 259–263.
10. Bak A., Cheung A.L., Yang C., Whitham S.A., Casteel C.L. A viral protease relocalizes in the presence of the vector to promote vector performance // *Nature Communications* 2017 8:1. 2017. Vol. 8. № 1. P. 14493-.
11. Bamunusinghe D., Chaturvedi S., Seo J.-K., Rao A.L.N. Mutations in the capsid protein of Brome mosaic virus affecting encapsidation eliminate vesicle induction in planta: implications for virus cell-to-cell spread // *Journal of virology*. 2013. Vol. 87. № 16. P. 8982–8992.
12. Bamunusinghe D., Seo J.-K., Rao A.L.N. Subcellular Localization and Rearrangement of Endoplasmic Reticulum by Brome Mosaic Virus Capsid Protein // *Journal of Virology*. 2011. Vol. 85. № 6. P. 2953–2963.

13. Barajas D., Jiang Y., Nagy P.D. A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus // PLoS pathogens. 2009. Vol. 5. № 12.
14. Barajas D., Xu K., Castro Martín I.F. de, Sasvari Z., Brandizzi F., Risco C., Nagy P.D. Co-opted Oxysterol-Binding ORP and VAP Proteins Channel Sterols to RNA Virus Replication Sites via Membrane Contact Sites // PLOS Pathogens. 2014. Vol. 10. № 10. P. e1004388.
15. Bayer E.M., Benitez-Alfonso Y. Annual Review of Plant Biology Plasmodesmata: Channels Under Pressure Plant symplast: cytosolic continuum of cells interconnected by plasmodesmata bridges // 2026. Vol. 27. P. 12.
16. Behrens R.T., Aligeti M., Pocock G.M., Higgins C.A., Sherer N.M. Nuclear Export Signal Masking Regulates HIV-1 Rev Trafficking and Viral RNA Nuclear Export // Journal of Virology. 2017. Vol. 91. № 3. P. 2107–2123.
17. Berg R.H., Beachy R.N. Fluorescent Protein Applications in Plants // Methods Cell Biol. 2008. T. 85. C. 153–177.
18. Bernhofer M., Dallago C., Karl T., Satagopam V., Heinzinger M., Littmann M., Olenyi T., Qiu J., Schütze K., Yachdav G., Ashkenazy H., Ben-Tal N., Bromberg Y., Goldberg T., Kajan L., O'Donoghue S., Sander C., Schafferhans A., Schlessinger A., Vriend G., Mirdita M., Gawron P., Gu W., Jarosz Y., Trefois C., Steinegger M., Schneider R., Rost B. PredictProtein - Predicting Protein Structure and Function for 29 Years // Nucleic acids research. 2021. Vol. 49. № W1. P. W535–W540.
19. Boevink P., Oparka K., Cruz S.S., Martin B., Betteridge A., Hawes C. Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network // The Plant journal : for cell and molecular biology. 1998. Vol. 15. № 3. P. 441–447.
20. Boon J.A. den, Chen J., Ahlquist P. Identification of Sequences in Brome Mosaic Virus Replicase Protein 1a That Mediate Association with Endoplasmic Reticulum Membranes // Journal of Virology. 2001. Vol. 75. № 24. P. 12370–12381.
21. Borner G.H.H., Sherrier D.J., Weimar T., Michaelson L. V., Hawkins N.D., MacAskill A., Napier J.A., Beale M.H., Lilley K.S., Dupree P. Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts // Plant physiology. 2005. Vol. 137. № 1. P. 104–116.
22. Brandizzi F. Maintaining the structural and functional homeostasis of the plant endoplasmic reticulum // Developmental cell. 2021. Vol. 56. № 7. P. 919–932.
23. Brault M.L., Petit J.D., Immel F., Nicolas W.J., Glavier M., Brocard L., Gaston A., Fouché M., Hawkins T.J., Crowet J., Grison M.S., Germain V., Rocher M., Kraner M., Alva V., Claverol S., Paterlini A., Helariutta Y., Deleu M., Lins L., Tilsner J., Bayer E.M. Multiple C2 domains and transmembrane region proteins (MCTPs) tether membranes at plasmodesmata // EMBO reports. 2019. Vol. 20. № 8.
24. Burnett D., Hussein M., Barr Z.K., Näther L.N., Wright K.M., Tilsner J. Live-cell RNA imaging with the inactivated endonuclease Csy4 enables new insights into plant virus transport through plasmodesmata // PLOS Pathogens. 2025. Vol. 21. № 4. P. e1013049.

25. Cabanillas D.G., Jiang J., Movahed N., Germain H., Yamaji Y., Zheng H., Laliberté J.F. Turnip mosaic virus uses the snare protein vti11 in an unconventional route for replication vesicle trafficking // *Plant Cell*. 2018. Vol. 30. № 10. P. 2594–2615.
26. Cao X., Jin X., Zhang X., Li Y., Wang C., Wang X., Hong J., Wang X., Li D., Zhang Y. Morphogenesis of Endoplasmic Reticulum Membrane-Invaginated Vesicles during Beet Black Scorch Virus Infection: Role of Auxiliary Replication Protein and New Implications of Three-Dimensional Architecture // *Journal of virology*. 2015. Vol. 89. № 12. P. 6184–6195.
27. Castro I.F. de, Fernández J.J., Barajas D., Nagy P.D., Risco C. Three-dimensional imaging of the intracellular assembly of a functional viral RNA replicase complex // *Journal of Cell Science*. 2017. Vol. 130. № 1. P. 260–268.
28. Chang B.Y., Lin N.S., Liou D.Y., Chen J.P., Liou G.G., Hsu Y.H. Subcellular localization of the 28 kDa protein of the triple-gene-block of bamboo mosaic potexvirus // *The Journal of general virology*. 1997. Vol. 78 (Pt 5). № 5. P. 1175–1179.
29. Charton L., Plett A., Linka N. Plant peroxisomal solute transporter proteins // *Journal of Integrative Plant Biology*. 2019. Vol. 61. № 7. P. 817–835.
30. Chen H., Zhou H.X. Prediction of solvent accessibility and sites of deleterious mutations from protein sequence // *Nucleic acids research*. 2005. Vol. 33. № 10. P. 3193–3199.
31. Chen S., Desai T., McNew J.A., Gerard P., Novick P.J., Ferro-Novick S. Lunapark stabilizes nascent three-way junctions in the endoplasmic reticulum // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015. Vol. 112. № 2. P. 418–423.
32. Cheng G., Yang Z., Zhang H., Zhang J., Xu J. Remorin interacting with PCaP1 impairs Turnip mosaic virus intercellular movement but is antagonised by VPg // *New Phytologist*. 2020. Vol. 225. № 5. P. 2122–2139.
33. Chowdhury S.R., Bhattacharjee C., Casler J.C., Jain B.K., Glick B.S., Bhattacharyya D. ER arrival sites associate with ER exit sites to create bidirectional transport portals // *The Journal of cell biology*. 2020. Vol. 219. № 4.
34. Christensen N., Tilsner J., Bell K., Hammann P., Parton R., Lacomme C., Oparka K. The 5' cap of tobacco mosaic virus (TMV) is required for virion attachment to the actin/endoplasmic reticulum network during early infection // *Traffic*. 2009. Vol. 10. № 5. P. 536–551.
35. Cillo F., Roberts I.M., Palukaitis P. In situ localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of Cucumber mosaic virus in tobacco and cucumber // *Journal of virology*. 2002. Vol. 76. № 21. P. 10654–10664.
36. Cui H., Tsuda K., Parker J.E. Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense // *Annual Review of Plant Biology*. 2015. Vol. 66. № Volume 66, 2015. P. 487–511.
37. Cui W., Lee J.Y. Arabidopsis callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress // *Nature plants*. 2016. Vol. 2. № 5.

38. Cui X., Lu L., Wang Y., Yuan X., Chen X. The interaction of soybean reticulon homology domain protein (GmRHP) with Soybean mosaic virus encoded P3 contributes to the viral infection // *Biochemical and biophysical research communications*. 2018. Vol. 495. № 3. P. 2105–2110.
39. Dai Z., Rongrong He |, Bernards M.A., Wang | Aiming. The cis-expression of the coat protein of turnip mosaic virus is essential for viral intercellular movement in plants // 2020.
40. Desvoyes B., Faure-Rabasse S., Chen M.H., Park J.W., Scholthof H.B. A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein // *Plant physiology*. 2002. Vol. 129. № 4. P. 1521–1532.
41. Diaz A., Ahlquist P. Role of host reticulon proteins in rearranging membranes for positive-strand RNA virus replication // *Current Opinion in Microbiology*. 2012. Vol. 15. № 4. P. 519–524.
42. Diaz A., Gallei A., Ahlquist P. Bromovirus RNA Replication Compartment Formation Requires Concerted Action of 1a's Self-Interacting RNA Capping and Helicase Domains // *Journal of Virology*. 2012a. Vol. 86. № 2. P. 821–834.
43. Diaz A., Gallei A., Ahlquist P. Bromovirus RNA replication compartment formation requires concerted action of 1a's self-interacting RNA capping and helicase domains // *Journal of virology*. 2012b. Vol. 86. № 2. P. 821–834.
44. Diaz A., Wang X. Bromovirus-induced remodeling of host membranes during viral RNA replication // *Current Opinion in Virology*. 2014. Vol. 9. P. 104–110.
45. Diaz A., Wang X., Ahlquist P. Membrane-shaping host reticulon proteins play crucial roles in viral RNA replication compartment formation and function // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. Vol. 107. № 37. P. 16291–16296.
46. Diaz A., Zhang J., Ollwerther A., Wang X., Ahlquist P. Host ESCRT Proteins Are Required for Bromovirus RNA Replication Compartment Assembly and Function // *PLOS Pathogens*. 2015. Vol. 11. № 3. P. e1004742.
47. Dohi K., Mori M., Furusawa I., Mise K., Okuno T. Brome mosaic virus replicase proteins localize with the movement protein at infection-specific cytoplasmic inclusions in infected barley leaf cells // *Archives of Virology*. 2001. Vol. 146. № 8. P. 1607–1615.
48. Ehlers K., Kollmann R. Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin, and functioning // *Protoplasma*. 2001. Vol. 216. № 1–2. P. 1–30.
49. Epel B.L. Plant viruses spread by diffusion on ER-associated movement-protein-rafts through plasmodesmata gated by viral induced host β -1,3-glucanases // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2009. Vol. 20. № 9. P. 1074–1081.
50. Feng Z., Inaba J., Nagy P.D. Tombusviruses Target a Major Crossroad in the Endocytic and Recycling Pathways via Co-opting Rab7 Small GTPase // *Journal of virology*. 2021. Vol. 95. № 21.

51. Feng Z., Kovalev N., Nagy P.D. Multifunctional role of the co-opted Cdc48 AAA+ ATPase in tombusvirus replication // *Virology*. 2022. Vol. 576. P. 1–17.
52. Feng Z., Xue F., Xu M., Chen X., Zhao W., Garcia-Murria M.J., Mingarro I., Liu Y., Huang Y., Jiang L., Zhu M., Tao X. The ER-Membrane Transport System Is Critical for Intercellular Trafficking of the NSm Movement Protein and Tomato Spotted Wilt Tospovirus // *PLOS Pathogens*. 2016. Vol. 12. № 2. P. e1005443.
53. Ferralli J., Ashby J., Fasler M., Boyko V., Heinlein M. Disruption of Microtubule Organization and Centrosome Function by Expression of Tobacco Mosaic Virus Movement Protein // *Journal of Virology*. 2006. Vol. 80. № 12. P. 5807–5821.
54. Fridborg I., Grainger J., Page A., Coleman M., Findlay K., Angell S. TIP, A Novel Host Factor Linking Callose Degradation with the Cell-to-Cell Movement of Potato virus X // *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*. 2003. Vol. 16. № 2. P. 132–140.
55. Gao C., Zhuang X., Shen J., Jiang L. Plant ESCRT Complexes: Moving Beyond Endosomal Sorting // *Trends in Plant Science*. 2017. Vol. 22. № 11. P. 986–998.
56. García-Marcos A., Pacheco R., Manzano A., Aguilar E., Tenllado F. Oxylin Biosynthesis Genes Positively Regulate Programmed Cell Death during Compatible Infections with the Synergistic Pair Potato Virus X-Potato Virus Y and Tomato Spotted Wilt Virus // *Journal of Virology*. 2013. Vol. 87. № 10. P. 5769–5783.
57. Genovés A., Navarro J.A., Pallás V. Functional analysis of the five melon necrotic spot virus genome-encoded proteins // *Journal of General Virology*. 2006. Vol. 87. № 8. P. 2371–2380.
58. Genovés A., Navarro J.A., Pallas V. The Intra- and intercellular movement of Melon necrotic spot virus (MNSV) depends on an active secretory pathway // *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*. 2010. Vol. 23. № 3. P. 263–272.
59. Gomez-Aix C., García-García M., Aranda M.A., Sanchez-Pina M.A. Melon necrotic spot virus replication occurs in association with altered mitochondria // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2015. Vol. 28. № 4. P. 387–397.
60. Grangeon R., Agbeci M., Chen J., Grondin G., Zheng H., Laliberté J.-F. Impact on the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus of Turnip Mosaic Virus Infection // *Journal of Virology*. 2012. Vol. 86. № 17. P. 9255–9265.
61. Grangeon R., Jiang J., Wan J., Agbeci M., Zheng H., Laliberté J.F. 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection // *Frontiers in Microbiology*. 2013. Vol. 4. № DEC. P. 351.
62. Griffing L.R. Dancing with the Stars: Using Image Analysis to Study the Choreography of the Endoplasmic Reticulum and Its Partners and of Movement Within Its Tubules // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2018. Vol. 1691. P. 75–102.
63. Gronnier J., Gerbeau-Pissot P., Germain V., Mongrand S., Simon-Plas F. Divide and Rule: Plant Plasma Membrane Organization // *Trends in Plant Science*. 2018. Vol. 23. № 10. P. 899–917.

64. Gushchin V.A., Lukhovitskaya N.I., Andreev D.E., Wright K.M., Taliansky M.E., Solovyev A.G., Morozov S.Y., MacFarlane S.A. Dynamic localization of two tobamovirus ORF6 proteins involves distinct organellar compartments // *Journal of General Virology*. 2013. Vol. 94. № PART11. P. 230–240.
65. Hagiwara Y., Komoda K., Yamanaka T., Tamai A., Meshi T., Funada R., Tsuchiya T., Naito S., Ishikawa M. Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication // *EMBO Journal*. 2003. Vol. 22. № 2. P. 344–353.
66. Hamada T., Ueda H., Kawase T., Hara-Nishimura I. Microtubules Contribute to Tubule Elongation and Anchoring of Endoplasmic Reticulum, Resulting in High Network Complexity in Arabidopsis // *Plant Physiology*. 2014. Vol. 166. № 4. P. 1869–1876.
67. Hanton S.L., Matheson L.A., Chatre L., Brandizzi F. Dynamic organization of COPII coat proteins at endoplasmic reticulum export sites in plant cells // *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2009. Vol. 57. № 6. P. 963–974.
68. Harries P.A., Park J.W., Sasaki N., Ballard K.D., Maule A.J., Nelson R.S. Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009. Vol. 106. № 41. P. 17594.
69. Haupt S., Cowan G.H., Ziegler A., Roberts A.G., Oparka K.J., Torrance L. Two Plant–Viral Movement Proteins Traffic in the Endocytic Recycling Pathway // *The Plant Cell*. 2005. Vol. 17. № 1. P. 164.
70. Hayes R.J., Buck K.W. Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase // *Cell*. 1990. Vol. 63. № 2. P. 363–368.
71. He R., Li Y., Bernards M.A., Wang A. Manipulation of the Cellular Membrane-Cytoskeleton Network for RNA Virus Replication and Movement in Plants // *Viruses*. 2023. Vol. 15. № 3.
72. He W., He Y. Electron tomography for organelles, cells, and tissues // *Methods in Molecular Biology*. 2014. Vol. 1117. P. 445–483.
73. Heinlein M. Plant virus replication and movement // *Virology*. 2015. Vol. 479–480. P. 657–671.
74. Heinlein M., Padgett H.S., Gens J.S., Pickard B.G., Casper S.J., Epel B.L., Beachy R.N. Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection // *The Plant Cell*. 1998. Vol. 10. № 7. P. 1107.
75. Høie M.H., Kiehl E.N., Petersen B., Nielsen M., Winther O., Nielsen H., Hallgren J., Marcatili P. NetSurfP-3.0: accurate and fast prediction of protein structural features by protein language models and deep learning // *Nucleic acids research*. 2022. Vol. 50. № W1. P. W510–W515.
76. Hopp T.P., Prickett K.S., Price V.L., Libby R.T., March C.J., Cerretti D.P., Urdal D.L., Conlon P.J. A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification // *Bio/Technology* 1988 6:10. 1988. Vol. 6. № 10. P. 1204–1210.

77. Howard A.R., Heppler M.L., Ju H.J., Krishnamurthy K., Payton M.E., Verchot-Lubicz J. Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves // *Virology*. 2004. Vol. 328. № 2. P. 185–197.
78. Hsu H.T., Chou Y.L., Tseng Y.H., Lin Y.H., Lin T.M., Lin N.S., Hsu Y.H., Chang B.Y. Topological properties of the triple gene block protein 2 of Bamboo mosaic virus // *Virology*. 2008. Vol. 379. № 1. P. 1–9.
79. Hsu V.W., Yang J.S. Mechanisms of COPI vesicle formation // *FEBS Lett*. 2009. T. 583. № 23. C. 3758–3763.
80. Huang C., Heinlein M. Function of Plasmodesmata in the Interaction of Plants with Microbes and Viruses // *Methods in Molecular Biology*. : Humana Press Inc., 2022. C. 23–54.
81. Huang C., Mutterer J., Heinlein M. In Vivo Aniline Blue Staining and Semiautomated Quantification of Callose Deposition at Plasmodesmata // *Methods in Molecular Biology*. 2022. Vol. 2457. P. 151–165.
82. Huang C., Sede A.R., Elvira-González L., Yan Y., Rodriguez M.E., Mutterer J., Boutant E., Shan L., Heinlein M. dsRNA-induced immunity targets plasmodesmata and is suppressed by viral movement proteins // *The Plant Cell*. 2023. Vol. 35. № 10. P. 3845–3869.
83. Huh S.U., Kim M.J., Ham B.K., Paek K.H. A zinc finger protein Tsip1 controls Cucumber mosaic virus infection by interacting with the replication complex on vacuolar membranes of the tobacco plant // *The New phytologist*. 2011. Vol. 191. № 3. P. 746–762.
84. Hwang M.S., Kim K.N., Lee J.H., Park Y.I. Identification of amino acid sequences determining interaction between the cucumber mosaic virus-encoded 2a polymerase and 3a movement proteins // *The Journal of general virology*. 2007. Vol. 88. № Pt 12. P. 3445–3451.
85. Hwang M.S., Kim S.H., Lee J.H., Bae J.M., Paek K.H., Park Y.I. Evidence for interaction between the 2a polymerase protein and the 3a movement protein of Cucumber mosaic virus // *Journal of General Virology*. 2005. Vol. 86. № 11. P. 3171–3177.
86. Ibrahim A., Sasaki N., Schoelz J.E., Nelson R.S. Tobacco Mosaic Virus Movement: From Capsid Disassembly to Transport Through Plasmodesmata // *Viruses*. 2025. Vol. 17. № 2. P. 1–35.
87. Inaba J. ichi, Xu K., Kovalev N., Ramanathan H., Roy C.R., Lindenbach B.D., Nagy P.D. Screening Legionella effectors for antiviral effects reveals Rab1 GTPase as a proviral factor coopted for tombusvirus replication // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019. Vol. 116. № 43. P. 21739–21747.
88. Incarbone M., Scheer H., Hily J.M., Kuhn L., Erhardt M., Dunoyer P., Altenbach D., Ritzenthaler C. Characterization of a DCL2-Insensitive Tomato Bushy Stunt Virus Isolate Infecting *Arabidopsis thaliana* // *Viruses* 2020, Vol. 12,. 2020. Vol. 12. № 10.
89. Ishibashi K., Ishikawa M. Replication of Tobamovirus RNA // *Annu. Rev. Phytopathol*. 2016. T. 54. C. 55–78.

90. Jacquemond M. Cucumber Mosaic Virus. : Elsevier Inc., 2012. Issue. 1. P. 439–504.
91. Jiang Z., Yang M., Li D. Advances in understanding multifunctionality of Barley stripe mosaic virus γ b protein // PLOS Pathogens. 2025. Vol. 21. № 7. P. e1013299.
92. Jiang Z., Zhang K., Li Z., Li Z., Yang M., Jin X., Cao Q., Wang X., Yue N., Li D., Zhang Y. The Barley stripe mosaic virus γ b protein promotes viral cell-to-cell movement by enhancing ATPase-mediated assembly of ribonucleoprotein movement complexes // PLoS pathogens. 2020. Vol. 16. № 7.
93. Jin X., Cao X., Wang X., Jiang J., Wan J., Laliberté J.F., Zhang Y. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with plant virus replication // Front. Plant Sci. 2018. T. 9.
94. Jonczyk M., Pathak K.B., Sharma M., Nagy P.D. Exploiting alternative subcellular location for replication: Tombusvirus replication switches to the endoplasmic reticulum in the absence of peroxisomes // Virology. 2007. Vol. 362. № 2. P. 320–330.
95. Jørgensen K., Rasmussen A.V., Morant M., Nielsen A.H., Bjarnholt N., Zagrobelny M., Bak S., Møller B.L. Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products // Current Opinion in Plant Biology. 2005. Vol. 8. № 3. P. 280–291.
96. Jovanović I., Frantová N., Zouhar J. A sword or a buffet: plant endomembrane system in viral infections // Frontiers in Plant Science. 2023. Vol. 14. P. 1226498.
97. Ju H.J., Samuels T.D., Wang Y.S., Blancaflor E., Payton M., Mitra R., Krishnamurthy K., Nelson R.S., Verchot-Lubicz J. The Potato Virus X TGBp2 Movement Protein Associates with Endoplasmic Reticulum-Derived Vesicles during Virus Infection // Plant Physiology. 2005. Vol. 138. № 4. P. 1877–1895.
98. Kaido M., Abe K., Mine A., Hyodo K., Taniguchi T., Taniguchi H., Mise K., Okuno T. GAPDH-A Recruits a Plant Virus Movement Protein to Cortical Virus Replication Complexes to Facilitate Viral Cell-to-Cell Movement // PLOS Pathogens. 2014. Vol. 10. № 11. P. e1004505.
99. Kaido M., Inoue Y., Takeda Y., Sugiyama K., Takeda A., Mori M., Tamai A., Meshi T., Okuno T., Mise K. Downregulation of the NbNACa1 gene encoding a movement-protein-interacting protein reduces cell-to-cell movement of Brome mosaic virus in *Nicotiana benthamiana* // Molecular plant-microbe interactions : MPMI. 2007. Vol. 20. № 6. P. 671–681.
100. Kalderon D., Roberts B.L., Richardson W.D., Smith A.E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location // Cell. 1984. Vol. 39. № 3 PART 2. P. 499–509.
101. Kalinina N.O., Rakitina D.A., Yelina N.E., Zamyatnin J., Stroganova T.A., Klinov D. V., Prokhorov V. V., Ustinova S. V., Chernov B.K., Schiemann J., Solovyev A.G., Morozov S.Y. RNA-binding properties of the 63 kDa protein encoded by the triple gene block of poa semilatif hordeivirus // Journal of General Virology. 2001. Vol. 82. № 10. P. 2569–2578.
102. Kang B.H., Anderson C.T., Arimura S.I., Bayer E., Bezanilla M., Botella M.A., Brandizzi F., Burch-Smith T.M., Chapman K.D., Dünser K., Gu Y., Jaillais Y., Kirchhoff H., Otegui M.S., Rosado A., Tang Y., Kleine-Vehn J., Wang P., Zolman B.K. A glossary of plant cell structures: Current insights and future questions Get access // Plant Cell. 2022. Vol. 34. № 1. P. 10–52.

103. Kania U., Nodzyński T., Lu Q., Hicks G.R., Nerinckx W., Mishev K., Peurois F., Cherfils J., Rycke R. De, Gronès P., Robert S., Russinova E., Friml J. The inhibitor endosidin 4 targets sec7 domain-type arf gtpase exchange factors and interferes with subcellular trafficking in eukaryotes[open] // *Plant Cell*. 2018. Vol. 30. № 10. P. 2553–2572.
104. Kao Y.T., Gonzalez K.L., Bartel B. Peroxisome Function, Biogenesis, and Dynamics in Plants // *Plant Physiology*. 2018. Vol. 176. № 1. P. 162–177.
105. Karpova O. V., Zayakina O. V., Arkhipenko M. V., Sheval E. V., Kiselyova O.I., Poljakov V.Y., Yaminsky I. V., Rodionova N.P., Atabekov J.G., Atabekov J.G. Potato virus X RNA-mediated assembly of single-tailed ternary «coat protein-RNA-movement protein» complexes // *The Journal of general virology*. 2006. Vol. 87. № Pt 9. P. 2731–2740.
106. Kasteel D.T.J., Wel N.N. Van Der, Jansen K.A.J., Goldbach R.W., Lent J.W.M. Van. Tubule-forming capacity of the movement proteins of alfalfa mosaic virus and brome mosaic virus // *Journal of General Virology*. 1997. Vol. 78. № 8. P. 2089–2093.
107. Kim M.J., Ham B.K., Paek K.H. Novel protein kinase interacts with the Cucumber mosaic virus 1a methyltransferase domain // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006. Vol. 340. № 1. P. 228–235.
108. Kirchhoff H. Chloroplast ultrastructure in plants // *New Phytologist*. 2019. Vol. 223. № 2. P. 565–574.
109. Knox K., Wang P., Kriechbaumer V., Tilsner J., Frigerio L., Sparkes I., Hawes C., Oparka K. Putting the Squeeze on Plasmodesmata: A Role for Reticulons in Primary Plasmodesmata Formation // *Plant Physiology*. 2015. Vol. 168. № 4. P. 1563–1572.
110. Kovalev N., Fernández de Castro Martín I., Pogany J., Barajas D., Pathak K.B., Risco C., Nagy P.D. Role of Viral RNA and Co-opted Cellular ESCRT-I and ESCRT-III Factors in Formation of Tombusvirus Spherules Harboring the Tombusvirus Replicase // *Journal of Virology*. 2016. Vol. 90. № 7. P. 3611.
111. Kriechbaumer V., Botchway S.W., Slade S.E., Knox K., Frigerio L., Oparka K., Hawes C. Reticulomics: Protein-Protein Interaction Studies with Two Plasmodesmata-Localized Reticulon Family Proteins Identify Binding Partners Enriched at Plasmodesmata, Endoplasmic Reticulum, and the Plasma Membrane // *Plant physiology*. 2015. Vol. 169. № 3. P. 1933–1945.
112. Kriechbaumer V., Brandizzi F. The plant endoplasmic reticulum: an organized chaos of tubules and sheets with multiple functions // *J. Microsc.* 2020. T. 280. № 2. C. 122–133.
113. Kriechbaumer V., Breeze E., Pain C., Tolmie F., Frigerio L., Hawes C. Arabidopsis Lunapark proteins are involved in ER cisternae formation // *New Phytologist*. 2018. Vol. 219. № 3. P. 990–1004.
114. Kumar G., Dasgupta I. Variability, functions and interactions of plant virus movement proteins: What do we know so far? // *Microorganisms*. 2021. Vol. 9. № 4. P. 32–33.
115. Kusumanegara K., Mine A., Hyodo K., Kaido M., Mise K., Okuno T. Identification of domains in p27 auxiliary replicase protein essential for its association with the endoplasmic

- reticulum membranes in Red clover necrotic mosaic virus // *Virology*. 2012. Vol. 433. № 1. P. 131–141.
116. Laliberté J.F., Zheng H. Viral manipulation of plant host membranes // *Annual Review of Virology*. 2014. Vol. 1. № 1. P. 237–259.
117. Latham J.R., Wilson A.K. Transcomplementation and synergism in plants: implications for viral transgenes? // *Molecular plant pathology*. 2008. Vol. 9. № 1. P. 85–103.
118. Lazareva E.A., Lezzhov A.A., Chergintsev D.A., Golyshev S.A., Dolja V. V., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A.G. Reticulon-like properties of a plant virus-encoded movement protein // *The New phytologist*. 2021a. Vol. 229. № 2. P. 1052–1066.
119. Lazareva E.A., Lezzhov A.A., Dolja V. V., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A.G. Constriction of endoplasmic reticulum tubules by the viral movement protein BMB2 is associated with local BMB2 anchorage at constriction sites // *Plant Signaling and Behavior*. 2021b. Vol. 16. № 3.
120. Lazareva E.A., Lezzhov A.A., Golyshev S.A., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A.G. Similarities in intracellular transport of plant viral movement proteins BMB2 and TGB3 // *Journal of General Virology*. 2017a. Vol. 98. № 9. P. 2379–2391.
121. Lazareva E.A., Lezzhov A.A., Komarova T. V., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A.G. A novel block of plant virus movement genes // *Molecular plant pathology*. 2017. Vol. 18. № 5. P. 611–624.
122. Lee S.C., Wu C.H., Wang C.W. Traffic of a viral movement protein complex to the highly curved tubules of the cortical endoplasmic reticulum // *Traffic*. 2010. Vol. 11. № 7. P. 912–930.
123. Lent J.W.M. van, Schmitt-Keichinger C. Viral Movement Proteins Induce Tubule Formation in Plant and Insect Cells // *Cell-Cell Channels*. 2006. P. 160–175.
124. Levy A., Tilsner J. Creating Contacts Between Replication and Movement at Plasmodesmata – A Role for Membrane Contact Sites in Plant Virus Infections? // *Frontiers in Plant Science*. 2020. Vol. 11. № July. P. 1–8.
125. Levy A., Zheng J.Y., Lazarowitz S.G. Synaptotagmin SYTA Forms ER-Plasma Membrane Junctions that Are Recruited to Plasmodesmata for Plant Virus Movement // *Current Biology*. 2015. Vol. 25. № 15. P. 2018–2025.
126. Li J., Fuchs S., Zhang J., Wellford S., Schuldiner M., Wang X. An unrecognized function for COPII components in recruiting the viral replication protein BMV 1a to the perinuclear ER // 2016.
127. Li Z., Zhang Y., Jiang Z., Jin X., Zhang K., Wang X., Han C., Yu J., Li D. Hijacking of the nucleolar protein fibrillarin by TGB1 is required for cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus // *Molecular plant pathology*. 2018. Vol. 19. № 5. P. 1222–1237.
128. Li Z.P., Paterlini A., Glavier M., Bayer E.M. Intercellular trafficking via plasmodesmata: molecular layers of complexity // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2021. Vol. 78. № 3. P. 799–816.

129. Lin N.S., Langenberg W.G. Peripheral vesicles in proplastids of barley stripe mosaic virus-infected wheat cells contain double-stranded RNA // *Virology*. 1985. Vol. 142. № 2. P. 291–298.
130. Linnik O., Liesche J., Tilsner J., Oparka K.J. Unraveling the structure of viral replication complexes at super-resolution // *Frontiers in Plant Science*. 2013. Vol. 4. № JAN. P. 6.
131. Liu L., Westler W.M., Boon J.A. Den, Wang X., Diaz A., Steinberg H.A., Ahlquist P. An amphipathic α -helix controls multiple roles of brome mosaic virus protein 1a in RNA replication complex assembly and function // *PLoS Pathogens*. 2009. Vol. 5. № 3.
132. Liu T.Y., Bian X., Sun S., Hu X., Klemm R.W., Prinz W.A., Rapoport T.A., Hu J. Lipid interaction of the C terminus and association of the transmembrane segments facilitate atlastin-mediated homotypic endoplasmic reticulum fusion // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. Vol. 109. № 32. P. E2146.
133. Lucas W.J. Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes // *Virology*. 2006. Vol. 344. № 1. P. 169–184.
134. MacFarlane S.A., Popovich A.H. Efficient Expression of Foreign Proteins in Roots from Tobravirus Vectors // *Virology*. 2000. Vol. 267. № 1. P. 29–35.
135. Manfredi M., Savojardo C., Martelli P.L., Casadio R. DeepREx-WS: A web server for characterising protein–solvent interaction starting from sequence // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2021. Vol. 19. P. 5791–5799.
136. Marcos R., Izquierdo Y., Vellosillo T., Kulasekaran S., Cascón T., Hamberg M., Castresana C. 9-Lipoxygenase-Derived Oxylipins Activate Brassinosteroid Signaling to Promote Cell Wall-Based Defense and Limit Pathogen Infection // *Plant physiology*. 2015. Vol. 169. № 3. P. 2324–2334.
137. Martínez-Gil L., Sánchez-Navarro J.A., Cruz A., Pallás V., Pérez-Gil J., Mingarro I. Plant Virus Cell-to-Cell Movement Is Not Dependent on the Transmembrane Disposition of Its Movement Protein // *Journal of Virology*. 2009. Vol. 83. № 11. P. 5535–5543.
138. Martínez-Gil L., Saurí A., Vilar M., Pallás V., Mingarro I. Membrane insertion and topology of the p7B movement protein of Melon Necrotic Spot Virus (MNSV) // *Virology*. 2007. Vol. 367. № 2. P. 348–357.
139. Mastronarde D.N. Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution // *Journal of structural biology*. 1997. Vol. 120. № 3. P. 343–352.
140. Mastronarde D.N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements // *Journal of Structural Biology*. 2005. Vol. 152. № 1. P. 36–51.
141. Mathur J. Review: Morphology, behaviour and interactions of organelles // *Plant Science*. 2020. Vol. 301. P. 110662.
142. McCartney A.W., Greenwood J.S., Fabian M.R., White K.A., Mullen R.T. Localization of the Tomato Bushy Stunt Virus Replication Protein p33 Reveals a Peroxisome-to-Endoplasmic Reticulum Sorting Pathway // *The Plant Cell*. 2005. Vol. 17. № 12. P. 3513–3531.

143. McFarlane H.E., Lee E.K., Bezouwen L.S. Van, Ross B., Rosado A., Samuels A.L. Multiscale Structural Analysis of Plant ER–PM Contact Sites // *Plant and Cell Physiology*. 2017. Vol. 58. № 3. P. 478–484.
144. Melzer M.J., Sether D.M., Borth W.B., Hu J.S. Characterization of a Virus Infecting *Citrus volkameriana* with Citrus Leprosis-Like Symptoms // <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-11-0013>. 2011. Vol. 102. № 1. P. 122–127.
145. Mochizuki T., Hirai K., Kanda A., Ohnishi J., Ohki T., Tsuda S. Induction of necrosis via mitochondrial targeting of Melon necrotic spot virus replication protein p29 by its second transmembrane domain // *Virology*. 2009. Vol. 390. № 2. P. 239–249.
146. Morozov S.Y., Solovyev A.G. Triple gene block: Modular design of a multifunctional machine for plant virus movement // *Journal of General Virology*. 2003. Vol. 84. № 6. P. 1351–1366.
147. Morozov S.Y., Solovyev A.G. Did silencing suppression counter-defensive strategy contribute to origin and evolution of the triple gene block coding for plant virus movement proteins? // *Frontiers in Plant Science*. 2012. Vol. 3. № JUL. P. 1–4.
148. Morozov S.Y., Solovyev A.G. Phylogenetic relationship of some «accessory» helicases of plant positive-stranded RNA viruses: Toward understanding the evolution of triple gene block // *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6. № MAY. P. 137945.
149. Morozov S.Y., Solovyev A.G. Small hydrophobic viral proteins involved in intercellular movement of diverse plant virus genomes // *AIMS Microbiology*. 2020. Vol. 6. № 3. P. 305–329.
150. Morozov S.Y., Solovyev A.G. Bioinformatic Analysis Predicts a Novel Genetic Module Related to Triple Gene and Binary Movement Blocks of Plant Viruses: Tetra-Cistron Movement Block // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12. № 7.
151. Morozov S.Y., Solovyev A.G. Mechanisms of plant virus cell-to-cell transport: new lessons from complementation studies // *Frontiers in Plant Science*. 2024. Vol. 15. P. 1453464.
152. Moss T.J., Andrezza C., Verma A., Daga A., McNew J.A. Membrane fusion by the GTPase atlastin requires a conserved C-terminal cytoplasmic tail and dimerization through the middle domain // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. Vol. 108. № 27. P. 11133–11138.
153. Movahed N., Cabanillas D.G., Wan J., Vali H., Laliberté J.F., Zheng H. Turnip Mosaic Virus Components Are Released into the Extracellular Space by Vesicles in Infected Leaves // *Plant physiology*. 2019. Vol. 180. № 3. P. 1375–1388.
154. Movahed N., Patarroyo C., Sun J., Vali H., Laliberté J.F., Zheng H. Cylindrical inclusion protein of turnip mosaic virus serves as a docking point for the intercellular movement of viral replication vesicles // *Plant Physiology*. 2017a. Vol. 175. № 4. P. 1732–1744.
155. Movahed N., Patarroyo C., Sun J., Vali H., Laliberté J.F., Zheng H. Cylindrical Inclusion Protein of Turnip Mosaic Virus Serves as a Docking Point for the Intercellular Movement of Viral Replication Vesicles // *Plant physiology*. 2017b. Vol. 175. № 4. P. 1732–1744.

156. Nagano H., Mise K., Furusawa I., Okuno T. Conversion in the Requirement of Coat Protein in Cell-to-Cell Movement Mediated by the Cucumber Mosaic Virus Movement Protein // *Journal of Virology*. 2001. Vol. 75. № 17. P. 8045–8053.
157. Nagy P.D., Feng Z. Tombusviruses orchestrate the host endomembrane system to create elaborate membranous replication organelles // *Current Opinion in Virology*. 2021. Vol. 48. P. 30–41.
158. Nagy P.D., Pogany J., Xu K. Membranes and Lipids in the Formation of Viral Replication Compartment Induced by Tombusviruses // 2025. P. 2025.
159. Nagy P.D., Strating J.R.P.M., Kuppeveld F.J.M. van. Building Viral Replication Organelles: Close Encounters of the Membrane Types // *PLOS Pathogens*. 2016. Vol. 12. № 10. P. e1005912.
160. Navarro J.A., Genovés A., Climent J., Saurí A., Martínez-Gil L., Mingarro I., Pallás V. RNA-binding properties and membrane insertion of Melon necrotic spot virus (MNSV) double gene block movement proteins // *Virology*. 2006. Vol. 356. № 1–2. P. 57–67.
161. Navarro J.A., Pallás V. An Update on the Intracellular and Intercellular Trafficking of Carmoviruses // *Frontiers in plant science*. 2017. Vol. 8.
162. Navarro J.A., Sanchez-Navarro J.A., Pallas V. Key checkpoints in the movement of plant viruses through the host. : Elsevier Inc., 2019. Issue. 1. P. 1–64.
163. Nawaz-ul-Rehman M.S., Prasanth K.R., Xu K., Sasvari Z., Kovalev N., Castro Martín I.F. de, Barajas D., Risco C., Nagy P.D. Viral Replication Protein Inhibits Cellular Cofilin Actin Depolymerization Factor to Regulate the Actin Network and Promote Viral Replicase Assembly // *PLOS Pathogens*. 2016. Vol. 12. № 2. P. e1005440.
164. Nicolas W.J., Grison M.S., Trépout S., Gaston A., Fouché M., Cordelières F.P., Oparka K., Tilsner J., Brocard L., Bayer E.M. Architecture and permeability of post-cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves // *Nature Plants* 2017 3:7. 2017. Vol. 3. № 7. P. 17082-.
165. Niehl A., Heinlein M. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata // *Protoplasma*. 2011. Vol. 248. № 1. P. 75–99.
166. Nishisi K., Yoshidasn M., Fujiwaras D., Nishikawasii M., Horinouchis S., Beppus T. Leptomycin B Targets a Regulatory Cascade of crml, a Fission Yeast Nuclear Protein, Involved in Control of Higher Order Chromosome Structure and Gene Expression* // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. Vol. 269. № 9. P. 6320–6324.
167. Nurkiyanova K.M., Ryabov E. V., Kalinina N.O., Fan Y., Andreev I., Fitzgerald A.G., Palukaitis P., Taliansky M. Umbravirus-encoded movement protein induces tubule formation on the surface of protoplasts and binds RNA incompletely and non-cooperatively // *Journal of General Virology*. 2001. Vol. 82. № 10. P. 2579–2588.
168. Nziengui H., Schoefs B. Functions of reticulons in plants: What we can learn from animals and yeasts // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009. Vol. 66. № 4. P. 584–595.

169. Oikawa K., Matsunaga S., Mano S., Kondo M., Yamada K., Hayashi M., Kagawa T., Kadota A., Sakamoto W., Higashi S., Watanabe M., Mitsui T., Shigemasa A., Iino T., Hosokawa Y., Nishimura M. Physical interaction between peroxisomes and chloroplasts elucidated by in situ laser analysis // *Nature Plants* 2015 1:4. 2015. Vol. 1. № 4. P. 15035-.
170. Okinaka Y., Mise K., Suzuki E., Okuno T., Furusawa I. The C Terminus of Brome Mosaic Virus Coat Protein Controls Viral Cell-to-Cell and Long-Distance Movement // *Journal of Virology*. 2001. Vol. 75. № 11. P. 5385–5390.
171. Pain C., Kriechbaumer V., Kittelmann M., Hawes C., Fricker M. Quantitative analysis of plant ER architecture and dynamics // *Nature Communications* 2019 10:1. 2019. Vol. 10. № 1. P. 984-.
172. Pan R., Liu J., Wang S., Hu J. Peroxisomes: versatile organelles with diverse roles in plants // *New Phytologist*. 2020. Vol. 225. № 4. P. 1410–1427.
173. Pankratenko A. V., Atabekova A.K., Morozov S.Y., Solovyev A.G. Membrane Contacts in Plasmodesmata: Structural Components and Their Functions // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. Vol. 85. № 5. P. 531–544.
174. Pastor-Cantizano N., Ko D.K., Angelos E., Pu Y., Brandizzi F. Functional Diversification of ER Stress Responses in Arabidopsis // *Trends in biochemical sciences*. 2020. Vol. 45. № 2. P. 123–136.
175. Pathak K.B., Sasvari Z., Nagy P.D. The host Pex19p plays a role in peroxisomal localization of tombusvirus replication proteins // *Virology*. 2008. Vol. 379. № 2. P. 294–305.
176. Peiró A., Martínez-Gil L., Tamborero S., Pallás V., Sánchez-Navarro J.A., Mingarro I. The Tobacco mosaic virus Movement Protein Associates with but Does Not Integrate into Biological Membranes // *Journal of Virology*. 2014. Vol. 88. № 5. P. 3016–3026.
177. Pereira L.R., Rodrigues M.C., Chabi-Jesus C., Ramos-González P.L., Barbosa C.J., Santos M.G., Costa H., Maro L.C., Tassi A.D., Kitajima E.W., Harakava R., Freitas-Astúa J. Historical and Contemporary Evidence Confirms a Higrevirus as the Causal Agent of Citrus Zonate Chlorosis in Brazil // *Viruses*. 2025. Vol. 17. № 11. P. 1428.
178. Pérez-Sancho J., Smokvarska M., Dubois G., Glavier M., Sritharan S., Moraes T.S., Moreau H., Dietrich V., Platre M.P., Paterlini A., Li Z.P., Fouillen L., Grison M.S., Cana-Quijada P., Immel F., Wattelet V., Ducros M., Brocard L., Chambaud C., Luo Y., Ramakrishna P., Bayle V., Lefebvre-Legendre L., Claverol S., Zabrady M., Martin P.G.P., Busch W., Barberon M., Tilsner J., Helariutta Y., Russinova E., Taly A., Jaillais Y., Bayer E.M. Plasmodesmata act as unconventional membrane contact sites regulating intercellular molecular exchange in plants // *Cell*. 2025. Vol. 188. № 4. P. 958- 977.e23.
179. Pérez-Sancho J., Tilsner J., Samuels A.L., Botella M.A., Bayer E.M., Rosado A. Stitching Organelles: Organization and Function of Specialized Membrane Contact Sites in Plants // *Trends in cell biology*. 2016. Vol. 26. № 9. P. 705–717.

180. Pitzalis N., Heinlein M. The roles of membranes and associated cytoskeleton in plant virus replication and cell-to-cell movement // *Journal of Experimental Botany*. 2017. Vol. 69. № 1. P. 117–132.
181. Plett A., Charton L., Linka N. Peroxisomal Cofactor Transport // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10. № 8. P. 1174.
182. Pouwels J., Krogt G.N.M. Van Der, Lent J. Van, Bisseling T., Wellink J. The cytoskeleton and the secretory pathway are not involved in targeting the cowpea mosaic virus movement protein to the cell periphery // *Virology*. 2002. Vol. 297. № 1. P. 48–56.
183. Rao A., Chaturvedi S., Garmann R.F. Integration of replication and assembly of infectious virions in plant RNA viruses // *Current Opinion in Virology*. 2014. Vol. 9. P. 61–66.
184. Reichel C., Beachy R.N. Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum // *Cell Biology*. 1998. Vol. 95. P. 11169–11174.
185. Rolland N., Bouchnak I., Moyet L., Salvi D., Kuntz M. The main functions of plastids // *Methods in Molecular Biology*. : Humana Press Inc., 2018. C. 73–85.
186. Rosquete M.R., Davis D.J., Drakakaki G. The Plant Trans-Golgi Network: Not Just a Matter of Distinction // *Plant Physiology*. 2018. Vol. 176. № 1. P. 187–198.
187. Rouleau M., Smith R.J., Bancroft J.B., Mackie G.A. Purification, properties, and subcellular localization of foxtail mosaic potexvirus 26-kDa protein // *Virology*. 1994. Vol. 204. № 1. P. 254–265.
188. Rutter B.D., Innes R.W. Extracellular Vesicles Isolated from the Leaf Apoplast Carry Stress-Response Proteins // *Plant physiology*. 2017. Vol. 173. № 1. P. 728–741.
189. Sager R.E., Lee J.-Y. Plasmodesmata at a glance // *Journal of Cell Science*. 2018. Vol. 131. № 11.
190. Sambade A., Brandner K., Hofmann C., Seemanpillai M., Mutterer J., Heinlein M. Transport of TMV Movement Protein Particles Associated with the Targeting of RNA to Plasmodesmata // *Traffic*. 2008. Vol. 9. № 12. P. 2073–2088.
191. Samuels T.D., Ju H.J., Ye C.M., Motes C.M., Blancaflor E.B., Verchot-Lubicz J. Subcellular targeting and interactions among the Potato virus X TGB proteins // *Virology*. 2007. Vol. 367. № 2. P. 375–389.
192. Sasaki N., Kaido M., Okuno T., Mise K. Coat protein-independent cell-to-cell movement of bromoviruses expressing brome mosaic virus movement protein with an adaptation-related amino acid change in the central region. Brief Report // *Archives of Virology*. 2005. Vol. 150. № 6. P. 1231–1240.
193. Sasvari Z., Kovalev N., Gonzalez P.A., Xu K., Nagy P.D. Assembly-hub function of ER-localized SNARE proteins in biogenesis of tombusvirus replication compartment // *PLoS Pathogens*. 2018. Vol. 14. № 5.

194. Sasvari Z., Lin W., Inaba J.-I., Xu K., Kovalev N., Nagy P.D. Co-opted Cellular Sac1 Lipid Phosphatase and PI(4)P Phosphoinositide Are Key Host Factors during the Biogenesis of the Tombusvirus Replication Compartment // *Journal of Virology*. 2020. Vol. 94. № 12.
195. Sathanantham P., Zhao W., He G., Murray A., Fenech E., Diaz A., Schuldiner M., Wang X. A conserved viral amphipathic helix governs the replication site-specific membrane association // *PLoS Pathogens*. 2022. Vol. 18. № 9.
196. Schepetilnikov M. V., Manske U., Solovyev A.G., Zamyatnin A.A., Schiemann J., Morozov S.Y. The hydrophobic segment of Potato virus X TGBp3 is a major determinant of the protein intracellular trafficking // *The Journal of general virology*. 2005. Vol. 86. № Pt 8. P. 2379–2391.
197. Schepetilnikov M. V., Solovyev A.G., Gorshkova E.N., Schiemann J., Prokhnevsky A.I., Dolja V. V., Morozov S.Y. Intracellular targeting of a hordeiviral membrane-spanning movement protein: sequence requirements and involvement of an unconventional mechanism // *Journal of virology*. 2008. Vol. 82. № 3. P. 1284–1293.
198. Schmitz I., Rao A.L.N. Molecular Studies on Bromovirus Capsid Protein: I. Characterization of Cell-to-Cell Movement-Defective RNA3 Variants of Brome Mosaic Virus // *Virology*. 1996. Vol. 226. № 2. P. 281–293.
199. Schoberer J., Botchway S.W. Investigating protein-protein interactions in the plant endomembrane system using multiphoton-induced FRET-FLIM // *Methods in Molecular Biology*. 2014. Vol. 1209. P. 81–95.
200. Scholthof H.B., Scholthof K.B.G., Kikkert M., Jackson A.O. Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion // *Virology*. 1995. Vol. 213. № 2. P. 425–438.
201. Schwartz M., Chen J., Janda M., Sullivan M., Boon J. Den, Ahlquist P. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids // *Molecular Cell*. 2002. Vol. 9. № 3. P. 505–514.
202. Schwartz M., Chen J., Lee W.M., Janda M., Ahlquist P. Alternate, virus-induced membrane rearrangements support positive-strand RNA virus genome replication // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004. Vol. 101. № 31. P. 11263–11268.
203. Scorrano L., Matteis M.A. De, Emr S., Giordano F., Hajnóczky G., Kornmann B., Lackner L.L., Levine T.P., Pellegrini L., Reinisch K., Rizzuto R., Simmen T., Stenmark H., Ungermann C., Schuldiner M. Coming together to define membrane contact sites // *Nature Communications* 2019 10:1. 2019. Vol. 10. № 1. P. 1287-.
204. Serra-Soriano M., Antonio Navarro J., Pallás V. Dissecting the multifunctional role of the N-terminal domain of the Melon necrotic spot virus coat protein in RNA packaging, viral movement and interference with antiviral plant defence // *Molecular plant pathology*. 2017. Vol. 18. № 6. P. 837–849.

205. Shibata Y., Voss C., Rist J.M., Hu J., Rapoport T.A., Prinz W.A., Voeltz G.K. The reticulon and DP1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum // *The Journal of biological chemistry*. 2008. Vol. 283. № 27. P. 18892–18904.
206. Simpson C., Thomas C., Findlay K., Bayer E., Maule A.J. An Arabidopsis GPI-Anchor Plasmodesmal Neck Protein with Callose Binding Activity and Potential to Regulate Cell-to-Cell Trafficking // *The Plant Cell*. 2009. Vol. 21. № 2. P. 581.
207. Solovieva A.D., Frolova O.Y., Solovyev A.G., Morozov S.Y., Zamyatnin A.A. Effect of mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on programmed cell death induced by viral proteins in tobacco plants // *Biochemistry (Moscow)*. 2013. Vol. 78. № 9. P. 1006–1012.
208. 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.
209. Solovyev A.G., Kalinina N.O., Morozov S.Y. Recent advances in research of plant virus movement mediated by triple gene block // *Frontiers in plant science*. 2012. Vol. 3. № DEC.
210. Solovyev A.G., Morozov S.Y. Non-replicative Integral Membrane Proteins Encoded by Plant Alpha-Like Viruses: Emergence of Diverse Orphan ORFs and Movement Protein Genes // *Frontiers in plant science*. 2017. Vol. 8.
211. Solovyev A.G., Savenkov E.I., Agranovsky A.A., Morozov S.Y. Comparisons of the Genomic cis-Elements and Coding Regions in RNA β Components of the Hordeiviruses Barley Stripe Mosaic Virus, Lychnis Ringspot Virus, and Poa Semilatifolius Virus // *Virology*. 1996. Vol. 219. № 1. P. 9–18.
212. Sparkes I., Runions J., Hawes C., Griffing L. Movement and Remodeling of the Endoplasmic Reticulum in Nondividing Cells of Tobacco Leaves // *The Plant Cell*. 2009. Vol. 21. № 12. P. 3937.
213. Sparkes I., Tolley N., Aller I., Svozil J., Osterrieder A., Botchway S., Mueller C., Frigerio L., Hawes C. Five Arabidopsis reticulon isoforms share endoplasmic reticulum location, topology, and membrane-shaping properties // *The Plant cell*. 2010. Vol. 22. № 4. P. 1333–1343.
214. Storme N. De, Geelen D. Callose homeostasis at plasmodesmata: molecular regulators and developmental relevance // *Frontiers in plant science*. 2014. Vol. 5. № APR.
215. Su S., Liu Z., Chen C., Zhang Y., Wang X., Zhu L., Miao L., Wang X.C., Yuan M. Cucumber Mosaic Virus Movement Protein Severs Actin Filaments to Increase the Plasmodesmal Size Exclusion Limit in Tobacco // *The Plant Cell*. 2012. Vol. 22. № 4. P. 1373–1387.
216. Suzuki M., Yoshida M., Yoshinuma T., Hibi T. Interaction of replicase components between Cucumber mosaic virus and Peanut stunt virus // *The Journal of general virology*. 2003. Vol. 84. № Pt 7. P. 1931–1939.
217. Takagi J., Kimori Y., Shimada T., Hara-Nishimura I. Dynamic Capture and Release of Endoplasmic Reticulum Exit Sites by Golgi Stacks in Arabidopsis // *iScience*. 2020. Vol. 23. № 7. P. 101265.

218. Takeda A., Nakamura W., Sasaki N., Goto K., Kaido M., Okuno T., Mise K. Natural isolates of Brome mosaic virus with the ability to move from cell to cell independently of coat protein // *The Journal of general virology*. 2005. Vol. 86. № Pt 4. P. 1201–1211.
219. Tamai A., Kubota K., Nagano H., Yoshii M., Ishikawa M., Mise K., Meshi T. Cucumovirus- and bromovirus-encoded movement functions potentiate cell-to-cell movement of tobamo- and potexviruses // *Virology*. 2003. Vol. 315. № 1. P. 56–67.
220. Tamai A., Meshi T. Cell-to-cell movement of Potato virus X: the role of p12 and p8 encoded by the second and third open reading frames of the triple gene block // *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI. 2001. Vol. 14. № 10. P. 1158–1167.
221. Tang H., Zhu H. Specific Changes in Morphology and Dynamics of Plant Mitochondria under Abiotic Stress // *Horticulturae* 2023, Vol. 9., 2022. Vol. 9. № 1.
222. Tee E.E., Faulkner C. Plasmodesmata and intercellular molecular traffic control // *New Phytologist*. 2024. T. 243. № 1. C. 32–47.
223. Thomas C.L., Bayer E.M., Ritzenthaler C., Fernandez-Calvino L., Maule A.J. Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication // *PLoS Biology*. 2008. Vol. 6. № 1. P. 0180–0190.
224. Tilsner J., Amari K., Torrance L. Plasmodesmata viewed as specialised membrane adhesion sites // *Protoplasma*. 2011. Vol. 248. № 1. P. 39–60.
225. Tilsner J., Kriechbaumer V. Reticulons 3 and 6 interact with viral movement proteins // *Molecular Plant Pathology*. 2022. Vol. 23. № 12. P. 1807.
226. Tilsner J., Linnik O., Louveaux M., Roberts I.M., Chapman S.N., Oparka K.J. Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata // *Journal of Cell Biology*. 2013. Vol. 201. № 7. P. 981–995.
227. Tilsner J., Linnik O., Wright K.M., Bell K., Roberts A.G., Lacomme C., Cruz S.S., Oparka K.J. The TGB1 movement protein of potato virus X reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory // *Plant Physiology*. 2012. Vol. 158. № 3. P. 1359–1370.
228. Tilsner J., Nicolas W., Rosado A., Bayer E.M. Staying Tight: Plasmodesmal Membrane Contact Sites and the Control of Cell-to-Cell Connectivity in Plants // *Annual review of plant biology*. 2016. Vol. 67. P. 337–364.
229. Tilsner J., Oparka K.J. Missing links? — The connection between replication and movement of plant RNA viruses // *Current Opinion in Virology*. 2012. Vol. 2. № 6. P. 705–711.
230. Tolley N., Sparkes I., Craddock C.P., Eastmond P.J., Runions J., Hawes C., Frigerio L. Transmembrane domain length is responsible for the ability of a plant reticulon to shape endoplasmic reticulum tubules in vivo // *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2010. Vol. 64. № 3. P. 411–418.
231. Torrance L., Cowan G.H., Gillespie T., Ziegler A., Lacomme C. Barley stripe mosaic virus-encoded proteins triple-gene block 2 and gammab localize to chloroplasts in virus-infected

- monocot and dicot plants, revealing hitherto-unknown roles in virus replication // *The Journal of general virology*. 2006. Vol. 87. № Pt 8. P. 2403–2411.
232. Tran P.T.H., Asghar N., Johansson M., Melik W. Roles of the Endogenous Lunapark Protein during Flavivirus Replication // *Viruses* 2021, Vol. 13., 2021. Vol. 13. № 7.
233. Uchiyama A., Shimada-Beltran H., Levy A., Zheng J.Y., Javia P.A., Lazarowitz S.G. The Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses // *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. № November. P. 584.
234. Verchot-Lubicz J., Torrance L., Solovyev A.G., Morozov S.Y., Jackson A.O., Gilmer D. Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses // *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*. 2010. Vol. 23. № 10. P. 1231–1247.
235. Vicente J., Cascón T., Vicedo B., García-Agustín P., Hamberg M., Castresana C. Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense // *Molecular plant*. 2012. Vol. 5. № 4. P. 914–928.
236. Vilar M., Saurí A., Marcos J.F., Mingarro I., Pérez-Payá E. Transient structural ordering of the RNA-binding domain of carnation mottle virus p7 movement protein modulates nucleic acid binding // *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2005. Vol. 6. № 8. P. 1391–1396.
237. Viotti C., Bubeck J., Stierhof Y.D., Krebs M., Langhans M., Berg W. van den, Dongen W. van, Richter S., Geldner N., Takano J., Jürgens G., Vries S.C. de, Robinson D.G., Schumacher K. Endocytic and secretory traffic in Arabidopsis merge in the trans-golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle // *Plant Cell*. 2010. Vol. 22. № 4. P. 1344–1357.
238. Waigmann E., Ueki S., Trutnyeva K., Citovsky V. The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses // *CRC. Crit. Rev. Plant Sci*. 2004. T. 23. № 3. C. 195–250.
239. Wan J., Basu K., Mui J., Vali H., Zheng H., Laliberté J.-F. Ultrastructural Characterization of Turnip Mosaic Virus-Induced Cellular Rearrangements Reveals Membrane-Bound Viral Particles Accumulating in Vacuoles // *Journal of virology*. 2015. Vol. 89. № 24. P. 12441–12456.
240. Wang P., Duckney P., Gao E., Hussey P.J., Kriechbaumer V., Li C., Zang J., Zhang T. Keep in contact: multiple roles of endoplasmic reticulum–membrane contact sites and the organelle interaction network in plants // *New Phytologist*. 2023. Vol. 238. № 2. P. 482–499.
241. Wang P., Hawkins T.J., Richardson C., Cummins I., Deeks M.J., Sparkes I., Hawes C., Hussey P.J. The plant cytoskeleton, NET3C, and VAP27 mediate the link between the plasma membrane and endoplasmic reticulum // *Current Biology*. 2014. Vol. 24. № 12. P. 1397–1405.
242. Wang X., Cao X., Liu M., Zhang R., Zhang X., Gao Z., Zhao X., Xu K., Li D., Zhang Y. Hsc70-2 is required for Beet black scorch virus infection through interaction with replication and capsid proteins // *Scientific Reports* 2018 8:1. 2018. Vol. 8. № 1. P. 4526-.

243. Wang X., Jiang Z., Yue N., Jin X., Zhang X., Li Z., Zhang Y., Wang X., Han C., Yu J., Li D. Barley stripe mosaic virus γ b protein disrupts chloroplast antioxidant defenses to optimize viral replication // *The EMBO journal*. 2021a. Vol. 40. № 16.
244. Wang X., Ma J., Jin X., Yue N., Gao P., Mai K.K.K., Wang X.B., Li D., Kang B.H., Zhang Y. Three-dimensional reconstruction and comparison of vacuolar membranes in response to viral infection // *Journal of Integrative Plant Biology*. 2021b. Vol. 63. № 2. P. 353–364.
245. Wang X., Zhang Y., Xu J., Shi L., Fan H., Han C., Li D., Yu J. The R-rich motif of Beet black scorch virus P7a movement protein is important for the nuclear localization, nucleolar targeting and viral infectivity // *Virus Research*. 2012. Vol. 167. № 2. P. 207.
246. Watt L.G., Crawshaw S., Rhee S.J., Murphy A.M., Canto T., Carr J.P. The cucumber mosaic virus 1a protein regulates interactions between the 2b protein and ARGONAUTE 1 while maintaining the silencing suppressor activity of the 2b protein // *PLOS Pathogens*. 2020. Vol. 16. № 12. P. e1009125.
247. Wei T., Huang T.-S., McNeil J., Laliberté J.-F., Hong J., Nelson R.S., Wang A. Sequential Recruitment of the Endoplasmic Reticulum and Chloroplasts for Plant Potyvirus Replication // *Journal of Virology*. 2010. Vol. 84. № 2. P. 799–809.
248. Wei T., Wang A. Biogenesis of Cytoplasmic Membranous Vesicles for Plant Potyvirus Replication Occurs at Endoplasmic Reticulum Exit Sites in a COPI- and COPII-Dependent Manner // *Journal of Virology*. 2008. Vol. 82. № 24. P. 12252–12264.
249. Wel N.N. Van Der, Goldbach R.W., M. Van Lent J.W. The movement protein and coat protein of alfalfa mosaic virus accumulate in structurally modified plasmodesmata // *Virology*. 1998. Vol. 244. № 2. P. 322–329.
250. Wen W., Meinkoth J.L., Tsien R.Y., Taylor S.S. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus // *Cell*. 1995. Vol. 82. № 3. P. 463–473.
251. Wright K.M., Cowan G.H., Lukhovitskaya N.I., Tilsner J., Roberts A.G., Savenkov E.I., Torrance L. The N-terminal domain of PMTV TGB1 movement protein is required for nucleolar localization, microtubule association, and long-distance movement // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2010. Vol. 23. № 11. P. 1486–1497.
252. Wright Z.J., Bartel B. Peroxisomes form intraluminal vesicles with roles in fatty acid catabolism and protein compartmentalization in Arabidopsis // *Nature communications*. 2020. Vol. 11. № 1.
253. Wu G., Cui X., Chen H., Renaud J.B., Yu K., Chen X., Wang A. Dynamin-Like Proteins of Endocytosis in Plants Are Coopted by Potyviruses To Enhance Virus Infection // *Journal of Virology*. 2018. Vol. 92. № 23.
254. Wu G., Jia Z., Ding K., Zheng H., Lu Y., Lin L., Peng J., Rao S., Wang A., Chen J., Yan F. Turnip mosaic virus co-opts the vacuolar sorting receptor VSR4 to promote viral genome replication in plants by targeting viral replication vesicles to the endosome // *PLOS Pathogens*. 2022. Vol. 18. № 1. P. e1010257.

255. Wu X., Cheng X. Intercellular movement of plant RNA viruses: Targeting replication complexes to the plasmodesma for both accuracy and efficiency // *Traffic*. 2020. Vol. 21. № 12. P. 725–736.
256. Wu X., Liu J., Chai M., Wang J., Li D., Wang A., Cheng X. The Potato Virus X TGBp2 Protein Plays Dual Functional Roles in Viral Replication and Movement // *Journal of Virology*. 2019. Vol. 93. № 5.
257. Xue M., Arvy N., German-Retana S. The mystery remains: How do potyviruses move within and between cells? // *Molecular Plant Pathology*. 2023. Vol. 24. № 12. P. 1560–1574.
258. Yamashita S.I., Jin X., Furukawa K., Hamasaki M., Nezu A., Otera H., Saigusa T., Yoshimori T., Sakai Y., Mihara K., Kanki T. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy // *The Journal of cell biology*. 2016. Vol. 215. № 5. P. 649–665.
259. Yuan C., Lazarowitz S.G., Citovsky V. Identification of a functional plasmodesmal localization signal in a plant viral cell-to-cell-movement protein // *mBio*. 2016. Vol. 7. № 1.
260. Yuan X., Cao Y., Xi D., Guo L., Han C., Li D., Zhai Y., Yu J. Analysis of the subgenomic RNAs and the small open reading frames of Beet black scorch virus // *Journal of General Virology*. 2006. Vol. 87. № 10. P. 3077–3086.
261. Yue N., Jiang Z., Zhang X., Li Z., Wang X., Wen Z., Gao Z., Pi Q., Zhang Y., Wang X., Han C., Yu J., Li D. Palmitoylation of γ b protein directs a dynamic switch between Barley stripe mosaic virus replication and movement // *The EMBO Journal*. 2022. Vol. 41. № 13. P. e110060.
262. Zamyatnin A.A., Solovyev A.G., Savenkov E.I., Germundsson A., Sandgren M., Valkonen J.P.T., Morozov S.Y. Transient coexpression of individual genes encoded by the triple gene block of potato mop-top virus reveals requirements for TGBp1 trafficking // *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*. 2004. Vol. 17. № 8. P. 921–930.
263. Zancani M., Braidot E., Filippi A., Lippe G. Structural and functional properties of plant mitochondrial F-ATP synthase // *Mitochondrion*. 2020. Vol. 53. P. 178–193.
264. Zhang C., Hicks G.R., Raikhel N. V. Molecular composition of plant vacuoles: Important but less understood regulations and roles of tonoplast lipids // *Plants*. 2015. T. 4. № 2. C. 320–333.
265. Zhang G., Sanfaçon H. Characterization of membrane association domains within the Tomato ringspot nepovirus X2 protein, an endoplasmic reticulum-targeted polytopic membrane protein // *Journal of virology*. 2006. Vol. 80. № 21. P. 10847–10857.
266. Zhang K., Zhang Y., Yang M., Liu S., Li Z., Wang X., Han C., Yu J., Li D. The Barley stripe mosaic virus γ b protein promotes chloroplast-targeted replication by enhancing unwinding of RNA duplexes // *PLoS pathogens*. 2017. Vol. 13. № 4.
267. Zhang Q., Wen Z., Zhang X., She J., Wang X., Gao Z., Wang R., Zhao X., Su Z., Li Z., Li D., Wang X., Zhang Y. RETICULON-LIKE PROTEIN B2 is a proviral factor co-opted for the biogenesis of viral replication organelles in plants // *The Plant Cell*. 2023. Vol. 35. № 8. P. 3127.

268. Zhang Q., Zhang K., Li D., Wang X., Zhang Y. Replication Organelles of Plant Positive-Strand RNA Viruses: A Boost in Knowledge Following New Imaging Approaches // Annual Review of Phytopathology. 2025. Vol. 63. № 1. P. 451–476.
269. Zhang S., Tao F., Qing R., Tang H., Skuhersky M., Corin K., Tegler L., Wassie A., Wassie B., Kwon Y., Suter B., Entzian C., Schubert T., Yang G., Labahn J., Kubicek J., Maertens B. QTY code enables design of detergent-free chemokine receptors that retain ligand-binding activities // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018. Vol. 115. № 37. P. E8652–E8659.
270. Zhang Y., Zhang X., Niu S., Han C., Yu J., Li D. Nuclear localization of Beet black scorch virus capsid protein and its interaction with importin α // Virus research. 2011. Vol. 155. № 1. P. 307–315.
271. Zhuang X., Li R., Jiang L. A century journey of organelles research in the plant endomembrane system // Plant Cell. 2024. Vol. 36. № 5. P. 1312–1333.