

ШЕМЯКИНА Елена Андреевна

**ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА БЕЛКОВ
ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ, КОДИРУЕМЫХ ТРОЙНЫМ БЛОКОМ
ГЕНОВ ГОРДЕИ- И ПОМОВИРУСОВ**

03.01.03 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2011

Работа выполнена на кафедре вирусологии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук, профессор

Соловьев Андрей Геннадьевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук, профессор

Дунаевский Яков Ефимович

кандидат биологических наук

Эльдаров Михаил Анатольевич

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

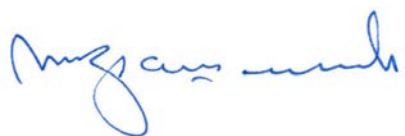
Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Защита состоится 17 июня 2011 года в ____ часов на заседании Совета Д501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, аудитория 536.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «__» мая 2011 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Крашенинников И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Изучение внутриклеточного транспорта вирусов растений является одной из актуальных проблем фитовирусологии. Понимание молекулярных механизмов внутриклеточного транспорта вирусных белков и нуклеиновых кислот позволяет лучше понимать физиологические процессы, происходящие в клетках растений, а также защитные механизмы, активирующиеся в ответ на инфекцию фитопатогенов.

Попадая в растительную клетку, вирусы используют существующие в ней клеточные структуры и транспортные пути для своего распространения и, таким образом, представляют собой удобную модель для изучения внутриклеточного транспорта. Основную роль в распространении вирусной инфекции играют вирус-специфические транспортные белки (ТБ), которые осуществляют доставку вирусного генома от сайтов репликации к плазмодесмам (ПД) – особым каналам, соединяющим растительные клетки, – и далее в соседние клетки. Геномы различных фитовирусов кодируют один или несколько ТБ, кроме того, для эффективного распространения некоторые из них нуждаются также в белке оболочки (Harries *et al.*, 2010).

Объектами данной работы являются ТБ гордеивирусного типа, кодируемые тройным блоком генов (ТБГ): белок ТБГ1 ВСВК (вирус скручивания верхушек картофеля, род *Potomovirus*) и белок ТБГ3 ПЛВМ (полулатентный вирус мятлика, род *Hordeivirus*). Белок ТБГ1 обладает РНК-связывающей активностью и образует вирусный рибонуклеопротеиновый комплекс (ВРНП-комплекс), а белок ТБГ3 участвует в доставке этого комплекса к ПД (Morozov & Solovyev, 2003, Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). В настоящее время известно, что белок ТБГ1 транспортируется к ПД при участии белков ТБГ2 и ТБГ3 (Morozov & Solovyev, 2003, Verchot-Lubicz *et al.*, 2010), но детали этого процесса не изучены. Также известно, что белок ТБГ3 транспортируется к ПД, минуя классические секреторные пути (Schepetilnikov *et al.*, 2008), однако механизмы этого транспорта также неясны. В настоящей работе предлагается модель транспорта белка ТБГ1, показывающая важность его взаимодействия с микротрубочками (МТ) для доставки в ПД, а также выявляется роль центрального гидрофильного района белка ТБГ3 и его С-концевого трансмембранного сегмента для его СОП-независимого транспорта в периферические мембранные компартменты, связанные с ПД.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение внутриклеточного транспорта белков ТБГ1 и ТБГ3 вирусов растений, кодируемых ТБГ гордеивирусного типа. В ходе работы решались следующие основные задачи:

1. Получение невирусного вектора, позволяющего экспрессировать три белка ТБГ в одной клетке одновременно в соотношении, близком к природному.
2. Изучение роли взаимодействия белка ТБГ1 с МТ клеток растений.
3. Идентификация последовательностей белка ТБГ1, ответственных за взаимодействия с МТ.
4. Изучение роли консервативного пентапептида YQDLN и С-концевого гидрофобного участка белка ТБГ3 в его транспорте в периферические мембранные тельца.

Научная новизна и практическая ценность работы

В ходе выполнения данной работы было показано, что белок ТБГ1 ВСВК вступает во взаимодействия с МТ. Получены данные о том, что эти взаимодействия необходимы для внутриклеточного транспорта белка ТБГ1. Картированы аминокислотные последовательности, отвечающие за взаимодействие белка ТБГ1 с МТ. Полученные в ходе работы данные выявили ключевые особенности неканонического механизма внутриклеточного транспорта белка ТБГ3 ПЛВМ в периферические мембранные структуры. Показано, что СОП-независимый транспорт белка ТБГ3 требует его олигомеризации, которая определяется консервативным пентапептидом YQDLN в центральном гидрофильном домене белка, тогда как истинный сигнал транспорта белка ТБГ3 находится в его С-концевом трансмембранном домене.

Результаты работы могут быть использованы в практике научных исследований в области молекулярной биологии и вирусологии. Полученные данные могут быть использованы для разработки новых подходов к созданию трансгенных растений, устойчивых к вирусной инфекции. Материалы диссертации могут быть использованы для чтения курсов лекций по вирусологии и молекулярной биологии.

Апробация работы

Диссертация была апробирована на совместном заседании кафедры вирусологии Биологического факультета и отдела биохимии вирусов растений НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

Материалы работы докладывались на семинарах кафедры вирусологии Биологического факультета МГУ и Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов–2011».

Публикации

По материалам диссертации опубликованы три печатных работы.

Структура работы

Диссертация состоит из глав «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список литературы».

Содержание работы

Взаимодействие белка ТБГ1 ВСВК с МТ

Ранее было показано, что при бомбардировке листьев *Nicotiana benthamiana* конструкцией, несущей ген белка ТБГ1 ВСВК, слитого с геном зеленого флуоресцирующего белка (green fluorescent protein, GFP), под контролем 35S-промотора, и последующей конфокальной микроскопии через 15–18 часов после бомбардировки, наблюдалось диффузное свечение GFP в ядре и цитоплазме (Zamyatnin *et al.*, 2004). В некоторых случаях слабая цитоплазматическая флуоресценция наблюдалась также в ассоциации с тонкими тяжами, напоминающими МТ (неопубликованные данные).

В настоящей работе клетки, подвергнутые бомбардировке конструкцией GFP-ТБГ1, анализировали с помощью микроскопии по истечении 24 и более часов после бомбардировки. При этом была выявлена выраженная локализация белка GFP-ТБГ1 на структурах, схожих с МТ (Рис. 1А, Б). При агроинfiltrации листьев табака *N. benthamiana* конструкцией, несущей ген белка GFP-ТБГ1, также была обнаружена ассоциация белка с МТ-подобными структурами (данные не показаны).

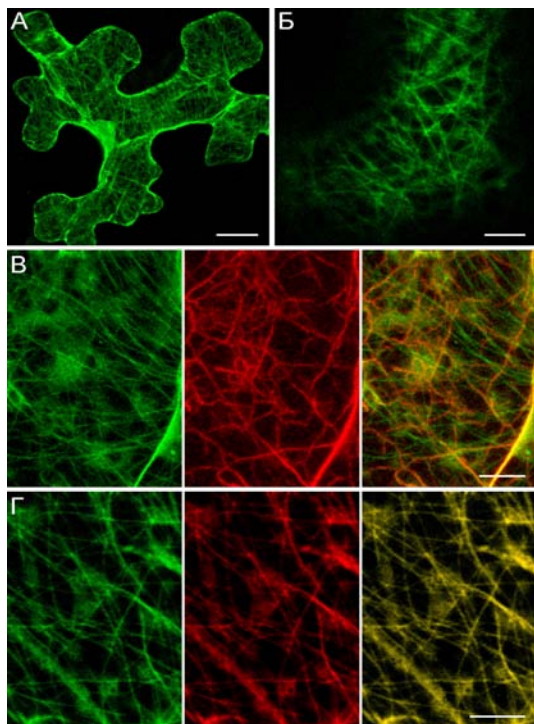


Рис. 1. Локализация белка GFP-ТБГ1 ВСВК через 24 часа после бомбардировки листьев *N. benthamiana*. Изображения получены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. **А** и **Б** – локализация белка GFP-ТБГ1. **В** – ко-локализация белка GFP-ТБГ1 с белком-маркером микрофиламентов YFP-Tal. **Г** – ко-локализация белка GFP-ТБГ1 с белком-маркером МТ YFP-MAP4. Для **В** и **Г**: сигнал GFP показан слева, сигнал YFP – в центре, наложение изображений – справа. Флуоресценция YFP представлена красным цветом для удобства наложения изображений. Изображения являются результатом наложения серии оптических срезов (**А**, **В** – **Г**) или представляют собой один оптический срез (**Б**). Масштабная линейка: **А** – 20 мкм, **Б** – 5 мкм, **В** и **Г** – 10 мкм.

Чтобы определить природу наблюдаемых МТ-подобных структур, белок GFP-ТБГ1 был ко-экспрессирован с белком-маркером микрофиламентов или белком-маркером МТ с помощью бомбардировки листьев *N. benthamiana*. В качестве маркера микрофиламентов был использован слитый с желтым флуоресцирующим белком (yellow fluorescent protein, YFP) актин-связывающий домен талина мыши (YFP-Tal) (Kost *et al.*, 1998). Для визуализации МТ использовали слитый с YFP МТ-связывающий домен белка MAP4 мыши (YFP-MAP4) (Marc *et al.*, 1998). При бомбардировке листьев векторами экспрессии, несущими гены белков GFP-ТБГ1 и YFP-Tal, наблюдалось полное разделение флуоресценции GFP и YFP между двумя различными типами нитевидных структур (Рис. 1В). Наоборот, при ко-экспрессии белка GFP-ТБГ1 с белком YFP-MAP4 сигналы GFP и YFP полностью ко-локализовались (Рис. 1Г). Эти данные показывают, что белок ТБГ1 ВСВК ассоциирован с МТ. Взаимодействия с МТ описаны и для других вирусных ТБ, прежде всего тобамовируса ВТМ (вирус табачной мозаики) (Heinlein *et al.*, 1995, Boyko *et al.*, 2000a, 2000b, 2007, Ashby *et al.*, 2006, Sambade *et al.*, 2008). При вирусной инфекции ТБ ВТМ взаимодействует с мембранами эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и с МТ, а также локализуется у ПД, изменяя их предельно-пропускную способность (ППС) (Talianky *et al.*, 2008, Epel, 2009, Heinlein & Epel, 2004). Предположительно, ВТМ транспортируется через ПД в виде vРНП-комплекса (Talianky *et al.*, 2008). Таким образом, белок ТБГ1 ВСВК и ТБ ВТМ имеют по крайней мере два общих свойства: способность связывать нуклеиновые кислоты и взаимодействовать с МТ (Heinlein & Epel, 2004, Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). С помощью мутационного анализа были выявлены последовательности ТБ ВТМ, отвечающие за взаимодействие с МТ (Kahn *et al.*, 1998, Boyko *et al.*, 2000c). При сравнении аминокислотной последовательности ТБ ВТМ и тубулинов были обнаружены схожие мотивы, консервативные для обоих белков (Boyko *et al.*, 2000b). Даже единичная аминокислотная замена в составе так называемого «тубулин-имитирующего домена» ТБ ВТМ приводит к потере ассоциации белка с МТ, что свидетельствует в пользу того, что ТБ ВТМ вступает в прямые взаимодействия с тубулином. Также эта гипотеза поддерживается данными, полученными *in vitro* (McLean *et al.*, 1995, Ashby *et al.*, 2006, Ferralli *et al.*, 2006, Sambade *et al.*, 2008). С другой стороны, в последовательности белка ТБГ1 ВСВК районов, схожих с «тубулин-имитирующим доменом», обнаружено не было. Однако предварительные данные указывают на возможность прямого взаимодействия белка ТБГ1 ВСВК с тубулином А1 *in vitro* (Е.А. Шемякина, неопубликованные данные).

Локализация белка ТБГ1 ВСВК в присутствии белков ТБГ2 и ТБГ3

Ранее для анализа внутриклеточной локализации белка ТБГ1 ВСВК в присутствии белков ТБГ2 и ТБГ3 использовалась экспериментальная система, основанная на бомбардировке листьев *N. benthamiana* двумя векторами экспрессии, один из которых нес

ген белка GFP-ТБГ1, а другой – гены белков ТБГ2 и ТБГ3 (Zamyatnin *et al.*, 2004). Последний из векторов обеспечивал экспрессию перекрывающихся генов ТБГ2 и ТБГ3 с одной мРНК, имитирующей субгеномную РНК, которая является природной матрицей для трансляции белков ТБГ2 и ТБГ3 при вирусной инфекции (Zhou & Jackson, 1996). В этой экспериментальной системе белок GFP-ТБГ1 был обнаружен во внутриклеточных точечных структурах (являющихся, предположительно, ПД) и в крупных периферических мембранных тельцах. Кроме того, белок GFP-ТБГ1 транспортировался из тех клеток, в которых экспрессировался после бомбардировки, в соседние клетки, что свидетельствует о том, что белки ТБГ2 и ТБГ3 могут обеспечивать транспорт белка GFP-ТБГ1 и к ПД, и через ПД в отсутствие других вирусных белков (Zamyatnin *et al.*, 2004). Однако данная система экспрессии транспортных белков имеет ряд недостатков. Во-первых, относительные количества двух экспрессионных векторов, доставляемых при бомбардировке в данную клетку, могут существенно варьировать, что приводит к различным соотношениям белка ТБГ1 и белков ТБГ2/ТБГ3 в разных клетках. Во-вторых, когда гены, кодирующие белок ТБГ1 и белки ТБГ2/ТБГ3, находятся под контролем 35S-промотора, они транслируются в клетках в соотношении ТБГ1:ТБГ2:ТБГ3 близком к 10:10:1, поскольку перекрывающиеся гены белков ТБГ2/ТБГ3 экспрессируются в соотношении 10:1 (Zhou & Jackson, 1996). Между тем показано, что в условиях вирусной инфекции соотношение уровня экспрессии белков ТБГ1:ТБГ2:ТБГ3 составляет 100:10:1 (Jackson *et al.*, 2009).

Для достижения соотношения экспрессируемых транспортных белков, близкого к природному, нами был сконструирован бинарный плазмидный вектор, содержащий две экспрессионные кассеты. Первая из них несла ген GFP-ТБГ1 под контролем сильного конститутивного 35S-промотора, тогда как вторая – перекрывающиеся гены, кодирующие белки ТБГ2 и ТБГ3, под контролем промотора нопалин-синтазы, существенно более слабого в сравнении с 35S-промотором (Sanders *et al.*, 1987). В этой конструкции промотор нопалин-синтазы обеспечивает синтез мРНК, имитирующей природную субгеномную РНК ВСВК, служащую, как предполагают, матрицей для трансляции и белка ТБГ2, и белка ТБГ3 (Jackson *et al.*, 2009, Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). Таким образом, впервые был получен невирусный вектор, экспрессирующий одновременно все три ТБ ВСВК и названный рLN-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3 (Рис. 2).

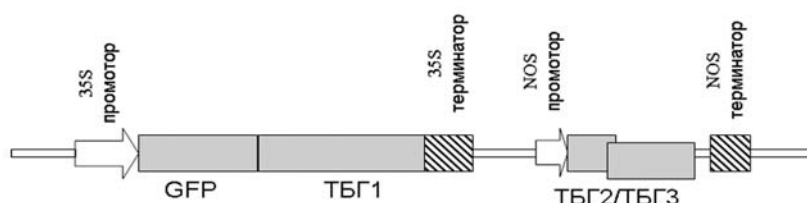


Рис. 2. Схематическое изображение бинарного вектора рLN-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3. Стрелками указаны промоторы, заштрихованными прямоугольниками – терминаторы. Гены, кодирующие белки GFP, ТБГ1, ТБГ2 и ТБГ3, обозначены серыми прямоугольниками.

Вектор рLН-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3 доставлялся в растения *N. benthamiana* с помощью агроинfiltrации. Локализацию белка GFP-ТБГ1 детектировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа в течение четырех дней после infiltration (д.п.и.).

На первый д.п.и. флуоресценция GFP в infiltrированных листьях не была обнаружена (данные не показаны). На второй д.п.и. флуоресценция GFP наблюдалась в ядре, где распределялась диффузно, а также в ассоциации с МТ, что соответствует фенотипу, наблюдаемому при экспрессии белка GFP-ТБГ1 в отсутствие белков ТБГ2 и ТБГ3 (Рис. 1А, Б и 3А). На третий д.п.и. GFP также детектировался в ядре и на МТ. Дополнительно были обнаружены небольшие GFP-ТБГ1-содержащие гранулярные тельца размером 0,3–0,8 мкм, расположенные вдоль МТ, а также вблизи клеточной стенки (Рис. 3Б, В). На четвертый д.п.и. белок GFP-ТБГ1 ВСВК по-прежнему детектировался в нуклеоплазме, большая часть белка находилась в составе гранулярных телец, локализованных вдоль клеточной стенки, также сохранялась остаточная ассоциация белка с МТ, наблюдаемая на более низком, чем в предыдущие дни, уровне (Рис. 3Г). Кроме того, на четвертый д.п.и. наблюдались аморфные включения, по размерам сопоставимые с клеточным ядром и имеющие преимущественно околядерную локализацию (Рис. 3Г).

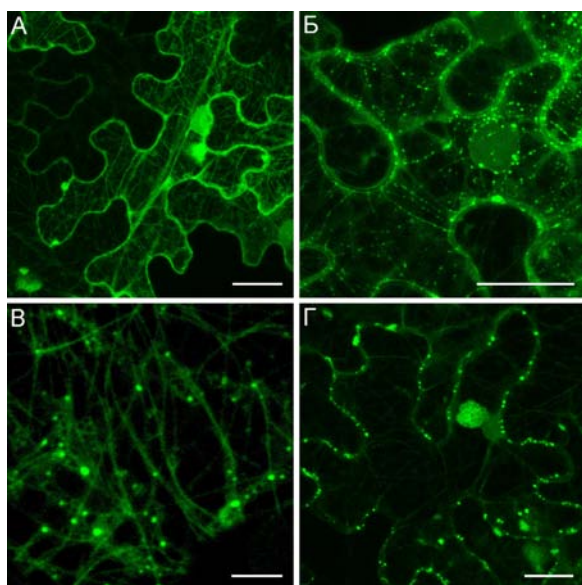


Рис. 3. Локализация белка GFP-ТБГ1 дикого типа, экспрессированного в составе вектора рLН-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3, после агроинfiltrации листьев *N. benthamiana*. Изображения получены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. А – 2 д.п.и. Б и В – 3 д.п.и. Г – 4 д.п.и. Показаны наложение серии оптических срезов (А, Б, Г) и единичный оптический срез (В). Масштабная линейка: А, Б и Г – 20 мкм, В – 5 мкм.

Эти включения внешне напоминали агросомы, описанные ранее в клетках животных (Johnston *et al.*, 1998) и относительно недавно – в клетках растений (Vogel *et al.*, 2007, Harries *et al.*, 2009a). Предполагается, что агросомы являются местами непротеосомной деградации белков и формируются МТ-зависимым путем, а именно за счет направленного транспорта по МТ белков и белковых агрегатов, подлежащих деградации (Johnston *et al.*, 1998, Harries *et al.*, 2009a). Важно отметить, что похожие на агросомы структуры детектировались в некоторых клетках *N. benthamiana*, infiltrированных вектором

экспрессии pLH-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3, уже на третий д.п.и. (данные не показаны).

Таким образом, в соответствии с данным, полученными ранее (Zamyatnin *et al.*, 2004), белок ТБГ1, экспрессируемый в присутствии белков ТБГ2 и ТБГ3, доставлялся к клеточной стенке. Необходимо отметить, что в проведенных ранее экспериментах, когда белки GFP-ТБГ1 и ТБГ2/ТБГ3 экспрессировались в результате ко-бомбардировки двумя векторами экспрессии, наблюдались два типа ТБГ1-содержащих структур, связанных с клеточной стенкой, – точечные включения в клеточной стенке, предположительно локализующиеся в ПД, и крупные мембранные структуры, расположенные вдоль клеточной стенки (Zamyatnin *et al.*, 2004). Последние структуры не наблюдались при экспрессии белков GFP-ТБГ1 и ТБГ2/ТБГ3 в результате агроинфильтрации двухкассетным вектором экспрессии, что указывает на то, что они могли возникать в результате гиперэкспрессии белка ТБГ2 и/или белка ТБГ3.

Получено достаточно много данных о роли МТ в транспорте вРНП-комплексов ВТМ. Небольшие подвижные ассоциированные с МТ тельца, представляющие собой комплексы, состоящие из ТБ и РНК, обнаружены в листьях табака, зараженного ВТМ, несущим ген температуро-чувствительного мутанта ТБ (Boyko *et al.*, 2007, Sambade *et al.*, 2008). Важно отметить, что подобные частицы образуются и при временной экспрессии ТБ ВТМ, они содержат РНК и ассоциированы с МТ. Предполагается, что ассоциация с МТ важна для направленного внутриклеточного транспорта вРНП-комплексов к ПД (Sambade *et al.*, 2008).

В случае ассоциированных с МТ гранулярных телец, содержащих белок ТБГ1 ВСВК, детектировать их движения не удалось. Тем не менее, можно предположить, что образование белок-ТБГ1-содержащих телец, связанных с МТ, является одной из первых стадий транспорта белка к ПД. В пользу этой гипотезы свидетельствует то, что ассоциация белка ТБГ1 с МТ и образование гранулярных телец всегда предшествовало появлению белка в других внутриклеточных структурах. Интересно, что белки Р2, Р3 и Р6 вируса мозаики цветной капусты также образуют ко-локализующиеся с МТ тельца и, кроме того, наличие МТ необходимо для формирования этих телец (Harries *et al.*, 2009a, Martiniere *et al.*, 2009). Возможно, вирусы, относящиеся к разным группам, используют одни и те же механизмы для формирования МТ-зависимых гранулярных телец и для их дальнейшего транспорта к периферии клетки.

Другая возможная функция взаимодействия ТБ с МТ – это транспорт избыточного белка к местам его деградации. Так, например, для ТБ ВТМ предполагается МТ-зависимая деградация ТБ (Cugin *et al.*, 2007), также показано, что МТ необходимы для деградации ТБ вируса скручивания листьев картофеля (Vogel *et al.*, 2007). Предполагается, что молекулы ТБ или образуемые ими небольшие агрегаты транспортируются вдоль МТ к местам

образования структур, схожих с агресомами (Vogel *et al.*, 2007). Подобная модель также предложена для формирования агресом в животных клетках в ответ на накопление гиперэкспрессированного или неправильно свернутого белка (Garcia-Mata *et al.*, 2002).

Белок ТБГ1 доставляется белками ТБГ2 и ТБГ3 в ПД

Чтобы подтвердить предположение о том, что внутрисклеточные включения, образуемые при экспрессии вектора рLH-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3 на четвертый д.п.и., ассоциированы с ПД, было применено окрашивание анилиновым синим. Этот краситель содержит сирофлуор, который специфически окрашивает каллозу, концентрирующуюся в области шейки ПД (Ding, 1998, Kim & Zambryski, 2005, Maule, 2008, Faulkner & Maule, 2011, Tilsner *et al.*, 2011). Было обнаружено, что гранулярные тельца в клеточной стенке, содержащие белок GFP-ТБГ1, ко-локализуются с окрашенными отложениями каллозы (Рис. 4А), что подтверждает локализацию белка ТБГ1 в ПД.

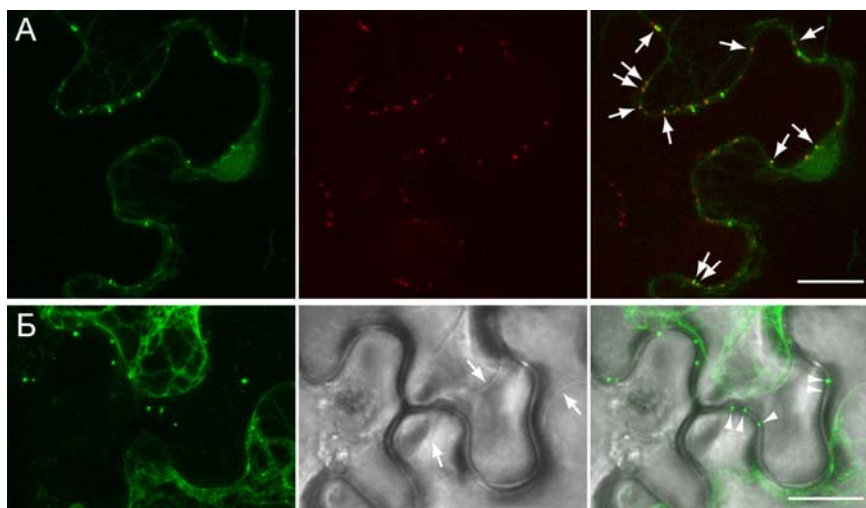


Рис. 4. Локализация белка GFP-ТБГ1, экспрессированного в составе вектора рLH-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3, в ПД эпителиальных клеток *N. benthamiana* на четвертый д.п.и. Изображения получены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Показан единственный медиальный срез. **А** – ко-локализация белка GFP-ТБГ1 с каллозой, окрашенной анилиновым синим. Сигнал GFP показан слева, сигнал каллозы – в центре, наложение изображений – справа. Флуоресценция каллозы представлена красным цветом для удобства наложения изображений. Стрелки указывают на перекрывающиеся сигналы от GFP и каллозы. **Б** – локализация белка GFP-ТБГ1 после плазмолиза. Сигнал GFP показан слева, изображение в проходящем свете – в центре, наложение изображений – справа. Стрелки на изображении в центре указывают на отделившуюся от клеточной стенки плазмалемму, стрелки на правом изображении – на оставшийся в клеточной стенке белок GFP-ТБГ1. Масштабная линейка: 15 мкм.

Было проанализировано, ассоциированы ли образуемые белком GFP-ТБГ1 структуры с ПД периферически или локализуются внутри канала ПД. Для этого листья *N. benthamiana*, агроинфицированные вектором рLH-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3, обрабатывали маннитолом, чтобы вызвать плазмолиз. Было обнаружено, что после плазмолиза образуемые белком GFP-ТБГ1 включения сохраняются в клеточной стенке, а не отходят

от нее вместе с плазмалеммой (Рис. 4Б). Это свидетельствует о том, что белок ТБГ1 локализуется внутри полости ПД.

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о локализации вирусных ТБ в ПД. Впервые такая локализация была показана для ТБ ВТМ (Hofmann *et al.*, 2007). ТБ ВТМ обеспечивает доставку ВРНП-комплекса к ПД и, кроме того, способен изменять ППС ПД (Wolf *et al.*, 1989, Hofmann *et al.*, 2007, Waigmann & Heinlein, 2007). Изменение ППС ПД необходимо для межклеточного транспорта вируса, поскольку ВРНП-комплексы не могут свободно диффундировать через просвет микроканалов ПД (Crawford & Zambryski, 2001, Taliansky *et al.*, 2008, Epel, 2009). Локализация в ПД показана и для ТБ гордеивирусного типа (Erhardt *et al.*, 2000, Haupt *et al.*, 2005, Lim *et al.*, 2009, Tilsner *et al.*, 2010). Считается, что белок ТБГ3 транспортирует и белок ТБГ2, и белок ТБГ1, связанный с вирусной РНК, к клеточной стенке, в то время как белок ТБГ2 обеспечивает прочность связи этих комплексов с ПД и, возможно, участвует в изменении ППС ПД (Morozov & Solovuev, 2003, Jackson *et al.*, 2009).

Снижение уровня экспрессии тубулина не блокирует внутриклеточный транспорт белка ТБГ1 ВСВК

Поскольку ассоциация белка ТБГ1 с МТ всегда предшествовала его локализации в клеточной стенке, была предпринята попытка оценить роль МТ во внутриклеточном транспорте белка ТБГ1 с помощью вирус-индуцированного сайленсинга (ВИС) тубулина. Для этого была получена конструкция TRV-TubAS, представляющая собой вектор экспрессии на основе вируса погрешковости табака (Ratcliff *et al.*, 2001), несущий фрагмент гена тубулина A1 *N. benthamiana*. Сходная конструкция была описана ранее для ВИС тубулина в растениях *N. benthamiana* (Gillespie *et al.*, 2002).

Молодые растения *N. benthamiana* агроинфильтрировали конструкцией TRV-TubAS на стадии четырех листьев. Инфильтрированные вектором TRV-TubAS растения отличались морфологически от контрольных растений, зараженных TRV-вектором, не несущим какой-либо вставки. Растения, подвергнутые ВИС тубулина, оставались карликовыми, новые растущие листья были более жесткими, они изгибались, закручивались и оставались мелкими, на некоторых листьях появлялись некрозы (Рис. 5А).

Через 20 дней после инфильтрации растений вирусным вектором TRV-TubAS ВИС проверяли с помощью агроинфильтрации маркера МТ GFP-MAP4 и анализа его локализации с использованием конфокального микроскопа. В контрольных листьях наблюдалась характерная локализация GFP-MAP4 в ассоциации с МТ (рис. 5В). В листьях с ВИС тубулина GFP-MAP4 образовывал либо обычные, но более редкие, тяжи, либо короткие палочковидные структуры (Рис. 5В).

В растениях, подвергнутых ВИС тубулина, экспрессировали конструкцию рLN-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3 через 20 дней после агроинфильтрации вектором TRV-

TubAS и анализировали локализацию белка GFP-ТБГ1 через три и четыре д.п.и. Было обнаружено, что белок ТБГ1 взаимодействует с остаточными МТ и локализуется в ПД (Рис. 5Г). Иммуноблот-анализ растений *N. benthamiana* с антителами к тубулину α , проведенный через 20 дней после агроинфильтрации вирусным вектором TRV-TubAS, показал, что в растениях с ВИС уровень тубулина существенно снижен в сравнении контрольными растениями (Рис. 5Б). Вместе с результатами микроскопии белка GFP-MAP4 в растениях, подвергнутых ВИС, эти данные говорят о том, что в использованных экспериментальных условиях ВИС не был полным. Это соответствует данным литературы, согласно которым при использовании ВИС в большинстве случаев полного выключения генов не происходит (Carlan & Dinesh-Kumar, 2006). Так, например, использование вектора TRV для сайленсинга генов PDS, CTR1 и CTR2 томата приводило к супрессии этих генов только на 80% (Liu *et al.*, 2002). При этом ВИС варьирует в зависимости от вида растения, его возраста, а также супрессируемого гена (Carlan & Dinesh-Kumar, 2006).

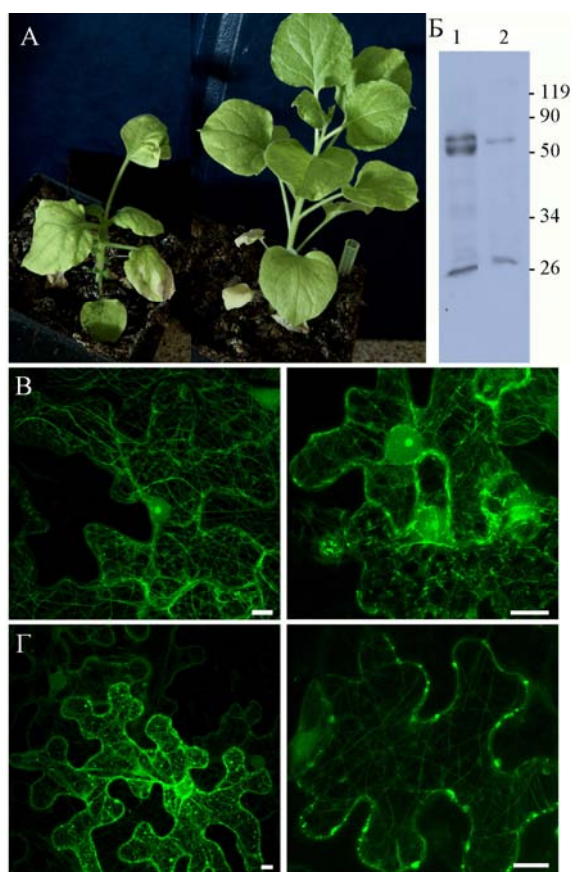


Рис. 5. Локализация белка-маркера МТ GFP-MAP4 и белка GFP-ТБГ1, экспрессированного в составе вектора pLN-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3, после 20-дневного ВИС тубулина в листьях *N. benthamiana*. **А** – изображение *N. benthamiana* после агроинфильтрации вектором TRV2-TubAS (слева) и TRV2 без вставки (справа). **Б** – иммуноблот с тубулин-специфическими антителами: дорожка 1 – экстракт из листьев, агроинфильтрированных TRV2 без вставки, дорожка 2 – экстракт из листьев, агроинфильтрированных TRV2-TubAS. Справа указаны молекулярные массы маркерных белков, кДа. **В** – локализация белка-маркера МТ GFP-MAP4 в листьях, агроинфильтрированных TRV2 без вставки (слева) и TRV2-TubAS (справа). **Г** – локализация белка GFP-ТБГ1 в листьях, агроинфильтрированных TRV2 без вставки (слева) и TRV2-TubAS (справа). **В** и **Г**: изображения получены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Показано наложение серии оптических срезов. Масштабная линейка: 10 мкм.

Таким образом, сайленсинг тубулина в наших экспериментах приводил к нарушению нормального развития у растений, что отражалось в их морфологической патологии. При этом, поскольку снижение уровня тубулина в клетках растений не ингибировало транспорт белка ТБГ1 к ПД, можно предполагать, что количество МТ не является лимитирующим фактором для внутриклеточного транспорта белка ТБГ1.

Обработка клеток колхицином ингибирует доставку белка ТБГ1 к ПД и образование агресом

В дальнейших экспериментах по выявлению роли МТ во внутриклеточной локализации белка ТБГ1 ВСКВ был проведен анализ транспорта белка ТБГ1 к ПД в листьях, обработанных колхицином – известным ингибитором полимеризации тубулина и формирования МТ. В качестве контроля использовались клетки, экспрессирующие белок GFP-МАР4. Колхицин добавлялся в буфер для агроинфильтрации и вводился в листья *N. benthamiana* одновременно с рLH-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3 или рLH-GFP-МАР4. Микроскопия образцов проводилась на третий и четвертый д.п.и. В листьях, обработанных колхицином и экспрессирующих белок GFP-МАР4, наблюдалась диффузная флуоресценция в цитоплазме, а также в ядре и ядрышке (Рис. 6А), что свидетельствует о разрушении МТ. В отличие от контрольных клеток, экспрессирующих белок ТБГ1 без обработки колхицином, в клетках листьев, обработанных колхицином, не наблюдалось локализации белка GFP-ТБГ1 на МТ и в ПД, а также не образовывались агресомы. В этих клетках флуоресценция наблюдалась в цитоплазме в ассоциации со структурами, напоминающими сеть ЭПР (Рис. 6Б). Таким образом, разрушение МТ колхицином блокирует транспорт белка ТБГ1 к плазмодесмам, а также ингибирует образование агресом.

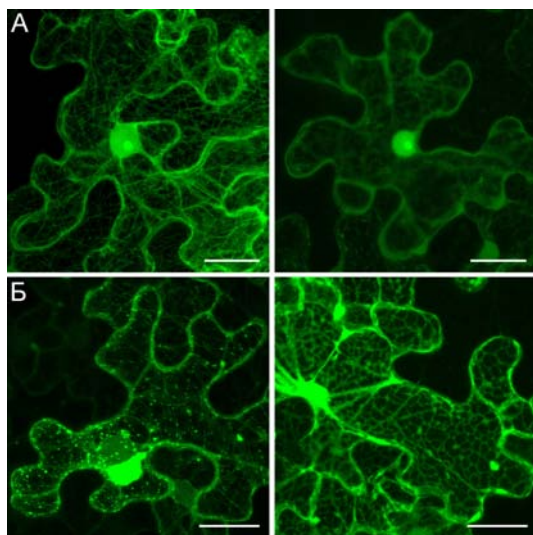


Рис. 6. Локализация белка GFP-ТБГ1, экспрессированного в составе вектора рLH-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3, и белка-маркера МТ GFP-МАР4 после обработки клеток *N. benthamiana* колхицином на третий д.п.и. Изображения получены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Показано наложение серии оптических срезов. **А** – локализация белка GFP-МАР4 в контрольных необработанных (слева) и обработанных (справа) колхицином клетках. **Б** – локализация белка GFP-ТБГ1 в контрольных необработанных (слева) и обработанных (справа) колхицином клетках. Масштабная линейка: 20 мкм.

Поскольку в клетках растений мембраны ЭПР находятся в тесном контакте с сетью микрофиламентов (Voevink *et al.*, 1998), последние могут играть существенную роль в обеспечении транспорта ТБ или вРНП-комплексов к ПД. С другой стороны, тяжи, образуемые МТ и микрофиламентами, находятся в тесном контакте на периферии клетки (Barton & Overall, 2010), поэтому ТБ или вРНП-комплексы, первоначально локализующиеся на МТ, могут отсоединяться от МТ и включаться в ЭПР-зависимый транспортный путь (Sambade *et al.*, 2008). Полученные нами данные косвенно

подтверждают такую модель транспорта для ВСВК. Разрушение МТ с помощью колхицина приводило к локализации белка GFP-ТБГ1 в структурах, напоминающих сеть ЭПР. Поскольку в отсутствие белков ТБГ2 и ТБГ3 белок ТБГ1 ВСВК не проявляет способности связываться с ЭПР, можно предположить, что белок ТБГ1 взаимодействует с ЭПР при участии интегральных трансмембранных белков ТБГ2 и/или ТБГ3, локализующихся в мембранах ЭПР или в производных от ЭПР компартментах (Mogozov & Solovyev, 2003, Verchot-Lubicz *et al.*, 2010).

Анализ мутантов белка ТБГ1 подтверждает взаимосвязь между ассоциацией белка с МТ и его транспортом в ПД

Для идентификации района белка ТБГ1, ответственного за взаимодействие с МТ, был использован ряд мутантов (Рис. 7). К ним относятся мутант ТБГ1-Mlu1 с делетированными аминокислотными остатками 37–85, описанный ранее (Zamyatnin *et al.*, 2004), и три новых делеционных мутанта, а именно мутант ТБГ1-dN с делецией первых 34 аминокислотных остатков, мутант ТБГ1-Mlu2 с делецией остатков 37–84 и мутант ТБГ1-HEL с удаленными первыми 188 аминокислотными остатками (Рис. 7). Кроме того, был получен ряд точечных мутантов (Рис. 7). В аминокислотной последовательности мутанта ТБГ1-GKN треонин заменен на аспарагин в консервативном мотиве GSGKT первого мотива NTPазного/хеликазного домена белка ТБГ1. Такая мутация ведет к нарушению энзиматической и регуляторной функций белка, поскольку происходит смещение сродства NTPазы от АТФ/ГТФ в сторону АДФ/ГДФ, что приводит к нарушению функций белка даже в присутствии АТФ (Feig, 1999, Nagy *et al.*, 2009). Мутанты ТБГ1-C2 и ТБГ1-C3 имеют аминокислотные замены в шестом консервативном домене NTPазного/хеликазного домена белка ТБГ1. Этот участок, предположительно, отвечает за взаимодействия белка ТБГ1 с белками ТБГ2 или ТБГ3 (Zamyatnin *et al.*, 2004). Мутантными генами белка ТБГ1 замещали ген дикого типа в векторе pLN-35S:GFP-ТБГ1-NOS:ТБГ2/ТБГ3, и полученные конструкции использовали для агроинфильтрации листьев *N. benthamiana*. Локализация белков детектировалась с помощью конфокального микроскопа в течение четырех д.п.и.

Было обнаружено, что белки с мутациями dN, Mlu1, GKN, C2 и C3 не теряли способности ассоциироваться с МТ и образовывать связанные с ними гранулярные тельца и доставляться в ПД, хотя по сравнению с белком дикого типа у некоторых мутантов эти взаимодействия были ослабленными (Табл. 1, Рис. 8). Так, в клетках, экспрессирующих мутанта ТБГ1-dN, на второй д.п.и. белок в основном диффузно распределялся в цитозоле, но при этом все же слабо ассоциировался с МТ (Рис. 8А). На третий д.п.и. наблюдалось по-прежнему крайне слабое взаимодействие белка с МТ, а также появлялись единичные

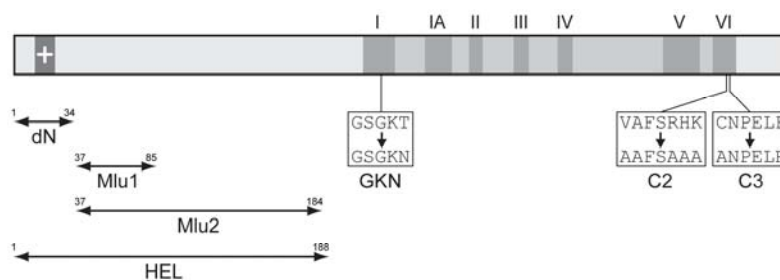


Рис. 7. Схематическое изображение мутаций, внесенных в белок ТБГ1 ВСВК. Аминокислотная последовательность белка представлена в виде прямоугольника. Закрашенные участки обозначают положение NTP/хеликазного домена с семью консервативными мотивами I – VI. Знаком «+» обозначена положительно заряженная область белка. Горизонтальными стрелками обозначены делеции, над стрелками обозначены положения удаленных аминокислотных остатков. В рамках обозначены произведенные замены аминокислотных остатков для точечных мутантов GKN, C2 и C3: в верхней строке представлены аминокислотные последовательности для белка дикого типа, в нижней – для мутантных белков.

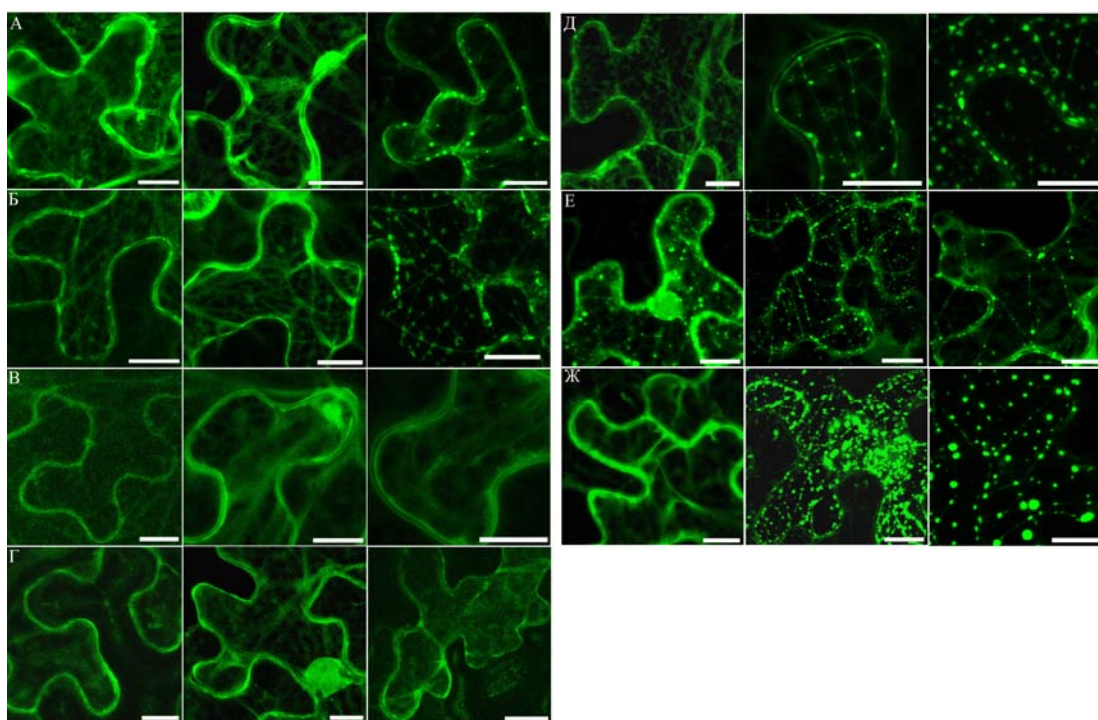


Рис. 8. Локализация мутантных белков GFP-ТБГ1, экспрессированных с помощью агроинfiltrации листьев *N. benthamiana* в составе вектора рLH-35S:GFP-ТБГ1мут-NOS:ТБГ2/ТБГ3, где ТБГ1мут – соответствующий мутант. Изображения получены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа путем наложения серии оптических срезов. Слева показана локализация белка на 2 д.п.и., в центре – на 3 д.п.и. и справа – на 4 д.п.и. А – локализация мутанта dN. Б – локализация мутанта Mlu1. В - локализация мутанта Mlu2. Г - локализация мутанта HEL. Д - локализация мутанта GKN. Е - локализация мутанта C2. Ж - локализация мутанта C3. Масштабная линейка: 10 мкм.

гранулярные тельца в ассоциации с ними, на четвертый д.п.и. количество гранулярных телец возрастало, белок достигал клеточной стенки (Рис. 8А). В клетках, экспрессирующих мутантный белок ТБГ1-Mlu1, детектировались лишь единичные МТ на протяжении первых трех дней наблюдений, на четвертый д.п.и. их количество увеличивалось и белок достигал клеточной стенки (Рис. 8Б). Точечный мутант ТБГ1-GKN на второй д.п.и. локализовался на МТ, хотя и в уменьшенном количестве в сравнении с белком дикого типа; на третий д.п.и. наблюдались типичные гранулярные тельца; и к

четвертому д.п.и. белок транспортировался в ПД (Рис. 8Д). Интересна локализация мутанта ТБГ1-С2: уже на второй д.п.и. он образовывал множество гранулярных телец на МТ, их количество возрастало к третьему д.п.и., причем практически весь находящийся в цитозоле белок вступал во взаимодействия с МТ. На четвертый д.п.и. количество белка, ассоциированного с МТ, сокращалось, частично мутантный белок ТБГ1 наблюдался распределенным диффузно по цитоплазме, однако какая-то его часть все же достигала клеточных стенок (Рис. 8Е). Мутантный белок ТБГ1-С3 на второй д.п.и. практически не локализовался на МТ, а был диффузно распределен в цитоплазме. Однако уже на третий д.п.и. он по большей части был ассоциирован с МТ и, кроме того, образовывал множественные гранулярные тельца как на МТ, так и в виде агрегатов около ядра. На четвертый д.п.и. белок ТБГ1-С3 по-прежнему сохранялся в ассоциации с МТ, образуя вдоль них более крупные по сравнению с белком дикого типа гранулярные тельца. Способность мутантного белка достигать клеточные стенки не блокировалась (Рис. 8Ж).

Таблица 1. Локализация мутантных белков ТБГ1 ВСВК

Белок ТБГ1	Ассоциация с МТ, 2 д.п.и.	Образование гранулярных телец, 3 д.п.и.	Локализация в ПД, 4 д.п.и.
Дикий тип	+++	+++	+++
dN	+	+	+
Mlu1	+	+	+
Mlu2	-	-	-
HEL	-	-	-
GKN	+	++	+
С2	++	+++	++
С3	+	++	+

Два из изученных мутантов – ТБГ1-Mlu2 и ТБГ1-HEL – полностью теряли способность к ассоциации с МТ, образованию гранулярных телец, а также транспорту к плазмодесмам (Табл. 1, Рис. 8В, Г). Следует отметить, что все мутантные белки, способные взаимодействовать с МТ, также образовывали похожие на агресомы структуры на четвертый д.п.и., что не наблюдалось у мутантов ТБГ1-Mlu2 и ТБГ1-HEL (данные не показаны).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что взаимодействие белка ТБГ1 с МТ предшествует его транспорту к ПД и необходимо для осуществления данного процесса. Более того, можно предположить, что во взаимодействиях белка ТБГ1 с МТ вовлечены последовательности с 86 по 184 аминокислотный остаток белка ТБГ1. Эта область включает в себя С-концевую часть неструктурированного N-концевого домена белка и часть внутреннего домена, имеющего выраженную вторичную структуру

(Makarov *et al.*, 2009). Первый из этих районов имеет незначительное сходство в белках ТБГ1 различных помовирусов, тогда как второй – весьма консервативен (данные не показаны), что позволяет предположить, что именно он может участвовать во взаимодействии с МТ.

Основываясь на полученных данных, мы предлагаем следующую модель транспорта белка ТБГ1 ВСВК. На ранней стадии инфекции белок ТБГ1 вступает в латеральные взаимодействия с МТ и формирует на них гранулярные тельца. Затем белок ТБГ2, накапливающийся в мембранах ЭПР, вступает во взаимодействие с белком ТБГ1 и транспортирует гранулярные тельца в места своей локализации; таким образом структуры, образуемые белком ТБГ1, оказываются в тесном контакте и с ЭПР, и с МТ. Возможно, формируемые белком ТБГ1 гранулярные тельца содержат также РНК, поскольку и белок ТБГ1, и белок ТБГ2 обладают РНК-связывающей активностью (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). Увеличение количества белка ТБГ3 с течением времени ведет к быстрому транспорту комплекса белков ТБГ1 и ТБГ2, связанных с РНК, по системе ЭПР к ПД и через них в соседние клетки.

Дальнейшее увеличение в ходе инфекции количества белка ТБГ1, связанного с МТ, ведет к его транспорту в околядерное пространство с образованием агрегатов и последующей деградацией. Такого рода утилизация белка может быть очень важна в особенности на последних стадиях инфекции, когда происходит формирование вирионов и обладающий РНК-связывающей активностью белок ТБГ1 может вступать в конкуренцию с белком оболочки за связывание с вирусной РНК. Таким образом, мы предполагаем, что МТ клеток растений необходимы как для формирования вРНП-комплексов ВСВК на ранних стадиях инфекции, так и для деградации избыточного количества белка ТБГ1 на поздних этапах инфекции.

Важно отметить, что в период, когда представленные в настоящей работе данные по ассоциации белка ТБГ1 ВСВК с МТ были приняты к печати, было опубликовано исследование внутриклеточной локализации белка GFP-ТБГ1 ВСВК, экспрессируемого в составе вирусного генома (Wright *et al.*, 2010). В этой работе была показана ассоциация белка ТБГ1 с МТ в процессе вирусной инфекции, что соответствует результатам, полученным в данной работе в безвирусной системе экспрессии. Было также показано, что район, участвующий во взаимодействии с МТ, расположен в N-концевой области белка ТБГ1, что согласуется с данными, представленными в настоящей работе, однако по результатам Wright *et al.* (2010) этот район расположен ближе к N-концу белка, чем картированный нами. Такое разногласие может объясняться использованием разных делеционных мутантов и несхожих систем экспрессии для анализа фенотипов мутантов. Кроме того, показано, что в контексте вирусной инфекции разрушение МТ колхицином не блокирует межклеточный транспорт вируса (Wright *et al.*, 2010). Однако эти результаты

могут требовать независимого подтверждения, поскольку в использованной постановке эксперимента обработка колхицином проводилась для листьев, где уже развилась вирусная инфекция (Wright *et al.*, 2010), поэтому увеличение локусов инфекции после обработки колхицином может объясняться не межклеточным транспортом вируса в этих условиях, а его накоплением в предзараженных клетках.

Обнаружение высокомолекулярных комплексов, образуемых белком ТБГ3 ПЛВМ, в инфицированных растениях

Ранее в нашей лаборатории было показано, что в трансгенных растениях, экспрессирующих природный или слитый с GFP белок ТБГ3 ПЛВМ, образуются высокомолекулярные комплексы, содержащие белок ТБГ3 (Gorshkova *et al.*, 2003). Чтобы убедиться в том, что образование таких комплексов отражает естественные свойства белка ТБГ3, а не является артефактом его гиперэкспрессии, в настоящей работе была предпринята попытка детектировать белок ТБГ3 ПЛВМ, экспрессируемый в контексте гордеивирусного генома. Для этого растения *N. benthamiana* заражали рекомбинантным гордеивирусом Р684, представляющим собой вирус штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ), в геноме которого ТБГ ВШМЯ был заменен на ТБГ ПЛВМ (Solovyev *et al.*, 1999). Образцы отбирали с инокулированных и верхних неинокулированных листьев в течение 21 дня после инокуляции и анализировали иммуноблотом с использованием моноклональных антител к белку ТБГ3 ПЛВМ (Gorshkova *et al.*, 2003). Поскольку белок ТБГ3 экспрессируется на очень низком уровне при вирусной инфекции (Zhou & Jackson, 1996, Jackson *et al.*, 2009) и локализуется в мембранах клетки (Gorshkova *et al.*, 2003), анализировали обогащенную мембранами фракцию из зараженных тканей (см. Материалы и методы). Было обнаружено, что в инокулированных листьях зараженных растений белок ТБГ3 ПЛВМ выявляется только в составе высокомолекулярных комплексов (Рис. 9). В системно инфицированных листьях обнаруживались образуемые белком ТБГ3 димеры, однако большая часть белка также включалась в мультимолекулярные комплексы (Рис. 9).

Таким образом, в зараженных растениях белок ТБГ3 ПЛВМ находится преимущественно в виде высокомолекулярных комплексов. Важно отметить, что эти комплексы, аналогично наблюдаемым комплексам в трансгенных растениях (Gorshkova *et al.*, 2003), также были устойчивы к нагреванию и обработке додецилсульфатом натрия и мочевиной, поскольку не диссоциировали при нагревании до 95°C в буфере для образцов, наносимых на гель.

Состав образуемых белком ТБГ3 комплексов неизвестен. Основываясь на данных о наличии гомологичных взаимодействий белка ТБГ3 ВСВК, обнаруженных в двугибридной дрожжевой системе Cowan *et al* (2002), мы предполагаем, что наблюдаемые нами комплексы включают олигомеры белка ТБГ3 ПЛВМ. В растениях, зараженных вирусом, эти комплексы также могут включать белок ТБГ2, способный вступать во

взаимодействия с белком ТБГ3 (Cowan *et al.*, 2002, Lim *et al.*, 2008) и котранспортироваться с белком ТБГ3 к клеточной стенке (Solovyev *et al.*, 2000, Zamyatnin *et al.*, 2002, Tilsner *et al.*, 2010).

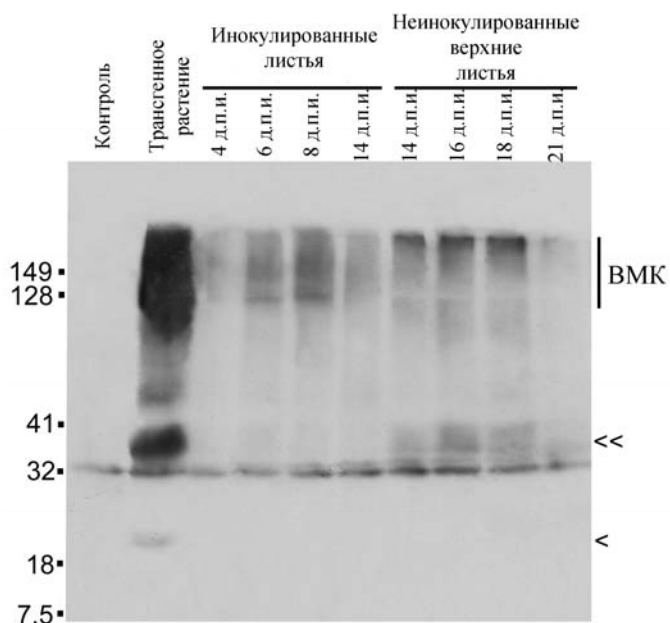


Рис. 9. Детекция белка ТБГ3 ПЛВМ в мембранной фракции листьев *N. benthamiana*, инокулированных рекомбинантным гордеивиром Р684. Анализ инокулированных и верхних неинокулированных листьев проводился с помощью иммуноблота с использованием моноклональных антител, специфичных к белку ТБГ3. В качестве контролей использовались трансгенное растение *N. benthamiana*, экспрессирующее белок ТБГ3 ПЛВМ, и неинокулированное нетрансгенное растение. Анализовали пробы, отобранные в указанные дни после инокуляции (д.п.и.). Слева обозначены молекулярные массы маркерных белков в кДа. «<<» и «<<<» обозначают положение образованных белком ТБГ3 мономеров и димеров, соответственно. Положение высокомолекулярных комплексов (ВМК) обозначено справа.

Недавно образование комплексов, включающих белки ТБГ2 и ТБГ3 вируса мозаики бамбука (ВМБ), относящегося к роду потексвирусов, было изучено в клетках дрожжей. Белок ТБГ3 ВМБ был обнаружен в ассоциированных с клеточной стенкой периферических мембранных тельцах и был способен транспортировать белок ТБГ2 из ЭПР в эти тельца (Lee *et al.*, 2010). Белки ТБГ2 и ТБГ3, синтезирующиеся на мембранах околядерного ЭПР клеток дрожжей, вступали во взаимодействия и образовывали гетеродимеры, которые затем олигомеризовались, образуя высокомолекулярные комплексы (Lee *et al.*, 2010). Возможно, такие комплексы соответствуют комплексам, обнаруживаемым в зараженных гордеивирусами клетках растений (Рис. 9).

Мутация в центральном консервативном домене белка ТБГ3 ПЛВМ препятствует образованию высокомолекулярных комплексов и блокирует его транспорт в периферические мембранные тельца

Ранее было показано, что белок ТБГ3 гордеивирусов содержит два сигнала, отвечающих за транспорт этого белка к ПД: один из них расположен в центральном гидрофильном участке, расположенном между двумя трансмембранными доменами, другой – в С-концевом трансмембранном домене (Solovyev *et al.*, 2000, Schepetilnikov *et al.*, 2008, Tilsner *et al.*, 2010). Мы проанализировали, участвуют ли эти сигналы в образовании высокомолекулярных комплексов, включающих белок ТБГ3 ПЛВМ. Для этого были использованы описанные ранее мутанты ТБГ3 ПЛВМ, а именно ТБГ3-мут71, имеющий вставку из четырех аминокислотных остатков RSTD в консервативном

пентапептиде YQDLN центрального гидрофильного участка белка, и ТБГ3-мут62 с полностью удаленным С-концевым трансмембранным доменом (Solovyev *et al.*, 2000, Schepetilnikov *et al.*, 2008) (Рис. 10). Гены, кодирующие мутантные белки и белок дикого типа, слитые с геном GFP, экспрессировали в листьях табака с помощью агроинфильтрации. На второй д.п.и. проводили анализ инфильтрированных листьев иммуноблотом с использованием специфических антител к белку ТБГ3 ПЛВМ (Gorshkova *et al.*, 2003). Было обнаружено, что белок дикого типа детектировался в виде полосы массой выше 117 кДа (Рис. 11), что соответствует высокомолекулярным комплексам, образуемым этим слитным белком в трансгенных растениях (Gorshkova *et al.*, 2003). Мутант GFP-ТБГ3-мут62 был также обнаружен в виде высокомолекулярного комплекса, в то время как мутант GFP-ТБГ3-мут71 образовывал только мономеры (Рис. 11). Таким образом, мутантный белок GFP-ТБГ3-мут71 теряет способность включаться в высокомолекулярные комплексы, характерные для белка дикого типа, что позволяет предположить, что высококонсервативный пентапептид YQDLN центрального гидрофильного участка белка ТБГ3 ПЛВМ необходим для образования таких комплексов.

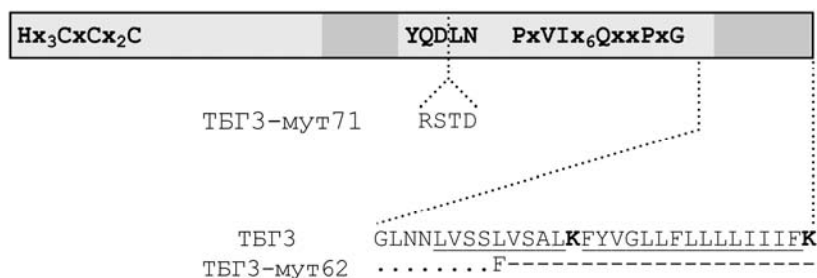


Рис. 10. Схематическое изображение белка ТБГ3 ПЛВМ и его мутантов. Аминокислотная последовательность белка ТБГ3 представлена в виде прямоугольника. Гидрофобные участки белка ТБГ3 обозначены темно-серым цветом. Указаны аминокислотные последовательности консервативных мотивов центрального гидрофильного и N-концевого доменов. Для мутанта ТБГ3-мут71 буквами RSTD обозначена тетрапептидная последовательность, нарушающая консервативный мотив YQDLN. С-концевая аминокислотная последовательность гидрофобного участка белка ТБГ3 дикого типа и его мутанта представлены внизу. Гидрофобные участки белка подчеркнуты, положительно заряженные остатки лизина выделены жирным шрифтом. Для мутанта белка ТБГ3-мут62 точками показана аминокислотная последовательность, оставшаяся без изменений, дефисами отмечены делетированные остатки.

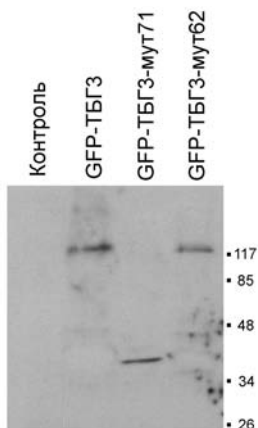


Рис. 11. Образование высокомолекулярных комплексов белком ТБГ3 ПЛВМ и его мутантами мут71 и мут62. Белки, слитые с GFP, экспрессировали в листьях *N. benthamiana* с помощью агроинфильтрации и анализировали иммуноблотом на 2 д.п.и. в 10%-ом ПААГ с использованием специфических моноклональных антител к белку ТБГ3. Контрольные листья были агроинфильтрированы вектором, не несущим вставки. Справа обозначены молекулярные массы маркерных белков в кДа.

Ранее было показано, что белки GFP-ТБГ3-мут71 и GFP-ТБГ3-мут62 локализируются в многочисленных гранулярных тельцах, диспергированных по цитоплазме (Schepetilnikov *et al.*, 2008, Рис. 12А, Б). В настоящей работе была изучена внутриклеточная локализация этих мутантов, слитых с красным флуоресцирующим белком DsRed (Matz *et al.*, 1999), которые экспрессировали в эпидермальных клетках листьев *N. benthamiana* с помощью бомбардировки. Было обнаружено, что белок DsRed-ТБГ3-мут62 образовывал большие околядерные структуры неизвестной природы, образующиеся, вероятно, в результате агрегации такого слитного белка (данные не показаны). Белок DsRed-ТБГ3-мут71 локализовался в структурах, расположенных вдоль клеточной стенки (Рис. 12Г), схожих с периферическими мембранными тельцами, образуемыми белком ТБГ3 дикого типа, слитым с GFP или с DsRed (Solovyev *et al.*, 2000, Zamyatnin *et al.*, 2002). Ко-экспрессия белка DsRed-ТБГ3-мут71 с белком-маркером ЭПР m-GFP5-ER, описанным ранее (Zamyatnin *et al.*, 2002), показала, что структуры, в которых локализуется белок DsRed-ТБГ3-мут71, как и периферические мембранные тельца, где локализуется белок DsRed-ТБГ3 (Zamyatnin *et al.*, 2002), содержат m-GFP5-ER и соединены со структурами кортикального ЭПР (Рис. 12В–Д). Эти наблюдения позволили предположить, что замена GFP на белок DsRed восстановила способность мутантного белка ТБГ3-мут71 к транспорту в периферические мембранные тельца. Такой эффект мог быть следствием склонности белка DsRed к образованию олигомеров и мультимерных комплексов (Baird *et al.*, 2000, Wall *et al.*, 2000). Эта гипотеза была проверена иммуноблот-анализом белка DsRed-ТБГ3-мут71, экспрессированного в листьях *N. benthamiana* с помощью агроинфильтрации. В случае, когда образцы для иммуноблот-анализа готовились по стандартной методике, включающей инкубацию при 95°C в течение 5 минут перед нанесением на полиакриламидный гель (ПААГ), и GFP-ТБГ3-мут71, и DsRed-ТБГ3-мут71 детектировались только в мономерной форме (Рис. 13). Известно, что белок DsRed мигрирует в ПААГ в виде олигомера с молекулярной массой свыше 100 кДа, если образцы перед нанесением на гель не нагревались до 95°C, и в виде мономера, если такое нагревание проводилось (Gross *et al.*, 2000). Основываясь на этих данных, экстракты из листьев, инфильтрированных мутантами GFP-ТБГ3-мут71 и DsRed-ТБГ3-мут71, были дополнительно проанализированы без нагревания, предшествующего нанесению образцов на ПААГ. Такая постановка эксперимента позволила детектировать белок DsRed-ТБГ3-мут71 в виде высокомолекулярного комплекса, в то время как белок GFP-ТБГ3-мут71 по-прежнему обнаруживался только в виде мономера (Рис. 13). Таким образом, слитный белок DsRed-ТБГ3-мут71, в отличие от GFP-ТБГ3-мут71, способен, подобно GFP-ТБГ3, входить в состав высокомолекулярных комплексов и транспортируется к периферическим мембранным тельцам. Это позволяет заключить, что формирование мультимерных комплексов белком ТБГ3 ПЛВМ является необходимым условием для его транспорта в

периферические структуры клеток растений. Этот вывод согласуется с данными, показывающими, что в клетках дрожжей образование специфических комплексов, содержащих белки ТБГ2 и ТБГ3 ВМБ, предшествует их транспорту в периферические мембранные тельца (Lee *et al.*, 2010).

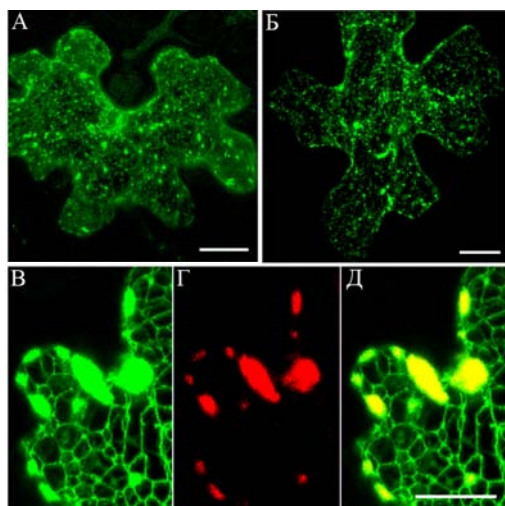


Рис. 12. Локализация белков GFP-ТБГ3-мут71, GFP-ТБГ3-мут62 и DsRed-ТБГ3-мут71, экспрессированных в *N. benthamiana* с помощью бомбардировки листьев. Изображения получены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Показано наложение серии оптических срезов. **А** – локализация белка GFP-ТБГ3-мут71. **Б** – локализация белка GFP-ТБГ3-мут62. **В, Г, Д** - ко-экспрессия DsRed-ТБГ3-мут71 и маркера структур ЭПР m-GFP5-ER. **В** – локализация m-GFP5-ER. **Г** – локализация белка DsRed-ТБГ3-мут71 в периферических мембранных тельцах. **Д** – наложение изображений **В** и **Г**. Масштабная линейка: **А** и **Б** – 20 мкм, **В, Г** и **Д** – 5 мкм.

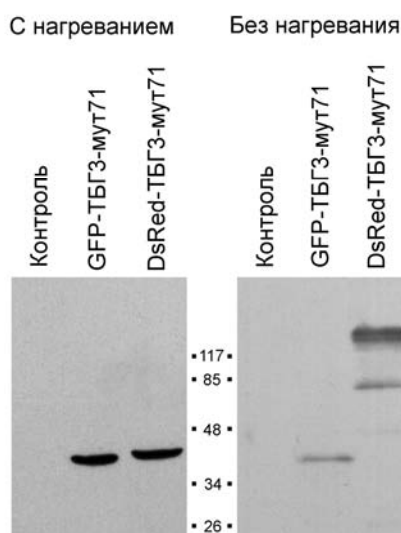


Рис. 13. Образование высокомолекулярных комплексов белками GFP-ТБГ3-мут71 и DsRed-ТБГ3-мут71. Белки экспрессировали в листьях *N. benthamiana* с помощью агроинфекции и анализировали иммуноблотом на 2 д.п.и. в 12%-ом ПААГ с использованием специфических моноклональных антител к белку ТБГ3. Контрольные листья были агроинфицированы вектором, не несущим вставки. Перед нанесением на гель образцы нагревались до 95°C (слева) или не нагревались (справа). Контрольные листья были инфицированы вектором, не несущим вставки. Цифрами обозначены молекулярные массы маркерных белков в кДа.

Полученные в настоящей работе данные, с одной стороны, подтверждают сделанный ранее вывод о существовании двух независимых сигналов, ответственных за транспорт белка ТБГ3 в периферические мембранные тельца (Schepetilnikov *et al.*, 2008, Lim *et al.*, 2009, Tilsner *et al.*, 2010), а с другой – впервые выявляют функциональное значение этих сигналов. Один из них, консервативный мотив YQDLN центрального гидрофильного участка белка ТБГ3, отвечает за включение этого белка в состав высокомолекулярных комплексов, что является необходимым условием внутриклеточного транспорта в периферические мембранные тельца. Другой сигнал находится на С-конце белка ТБГ3 во втором трансмембранном домене и, вероятнее всего, является истинным сигналом транспорта белка ТБГ3 к периферии клетки. Это предположение основывается на том, что белок ТБГ3 с нарушенной функцией мотива YQDLN все же транспортируется в

периферические тельца, когда его способность образовывать олигомерные комплексы восстанавливалась с помощью белка DsRed. Следует отметить, что у белка ТБГЗ потексвирусов за транспорт в периферические мембранные тельца также отвечает его трансмембранный домен (Schepetilnikov *et al.*, 2005).

Поскольку периферические мембранные тельца, в которых локализован белок ТБГЗ, содержат маркер ЭПР, они, как считается, являются субдоменами кортикального ЭПР (Zamyatnin *et al.*, 2002; Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). Недавно проведенные исследования транспорта белка ТБГЗ ВМБ в клетках дрожжей пролили свет на молекулярно-биологическую природу периферических мембранных телец. Было обнаружено, что эти структуры представляют собой участки кортикального ЭПР, обогащенного белками Rtn1 и Yop1 (Lee *et al.*, 2010). Ретикулоны (Rtn1) и белки, относящиеся к семейству DP1/Yop1, являются высоко консервативными интегральными белками, локализующимися в ЭПР, которые участвуют в формировании кривизны мембран в клетках дрожжей, растений и животных (Voeltz *et al.*, 2006, Voeltz & Prinz, 2007, English *et al.*, 2009, Nziengui & Schoefs, 2009, Shibata *et al.*, 2009). И белок Rtn1, и белки DP1/Yop1 имеют в своем составе домен, характерный для ретикулонов (RHD, reticulon homology domain), необходимый и достаточный для образования белками олигомерных комплексов и их локализации в мембранах ЭПР (Shibata *et al.*, 2008, English *et al.*, 2009). Топология домена RHD белков Rtn1 и DP1/Yop1 в мембране сходна с предсказанной топологией белка ТБГЗ гордеивирусного типа. Домен RHD состоит из двух гидрофобных последовательностей, разделенных гидрофильной петлей (Nziengui & Schoefs, 2009); сходным образом белок ТБГЗ состоит из центрального гидрофильного участка, разделяющего два трансмембранных домена (Morozov & Solovyev, 2003). Можно предположить, что, по аналогии с белками Rtn1 и DP1/Yop1, такая структура белка ТБГЗ важна для его внутриклеточного транспорта, закрепления в мембранах кортикального ЭПР и, возможно, стабилизации искривленных участков мембран ЭПР.

Кроме того, предполагается, что белки-ретикулоны участвуют в формировании и сохранении формы десмотубулы, мембрана которой обладает большой кривизной (Tilsner *et al.*, 2011). Белок ТБГЗ также может локализоваться внутри полости ПД, предположительно в мембранах десмотубулы, что показано для белков ТБГЗ ВШМЯ и ВСВК, которые оставались в клеточной стенке после плазмолиза, а не отходили от нее вместе с плазмалеммой (Lim *et al.*, 2009, Tilsner *et al.*, 2010). Таким образом, локализация белка ТБГЗ в десмотубуле и его способность транспортировать белок ТБГ1 к ПД могут обеспечивать механизм модификации ПД, основанный на изменении структуры и функций ПД (Tilsner *et al.*, 2011).

Включение белка ТБГ3 в состав высокомолекулярных комплексов необходимо для его СОРII-независимого внутриклеточного транспорта

Транспорт новосинтезированных трансмембранных белков из ЭПР к местам их локализации обеспечивается за счет транспортных СОРII-везикул (Mancias & Goldberg, 2005). Ранее было показано, что белок ТБГ3 транспортируется к клеточной стенке СОРII-независимым путем: использование доминантно-негативного мутанта малой клеточной ГТФазы Sar1[T34N], ингибирующего образование СОРII-везикул, не блокировало транспорт белков ТБГ3 ПЛВМ и Х-вируса картофеля (ХВК) к периферии клетки (Schepetilnikov *et al.*, 2005, 2008). В данной работе было проанализировано, влияет ли блокирование образования СОРII-везикул с помощью Sar1[T34N] на внутриклеточную локализацию мутантов ТБГ3-мут71 и ТБГ3-мут62. В качестве контроля использовался белок ST-YFP (Schepetilnikov *et al.*, 2005), который транспортируется из ЭПР в аппарат Гольджи (АГ) СОРII-зависимым путем (Saint-Jore *et al.*, 2002). В соответствии с ранее опубликованными данными, белок ST-YFP локализовался в виде мобильных телец, являющихся структурами АГ (Рис. 14А), в то время как ко-экспрессия белка ST-YFP с мутантом Sar1[T34N] приводила к локализации белка ST-YFP в мембранах ЭПР вследствие блокирования СОРII-зависимого транспорта (Schepetilnikov *et al.*, 2005, 2008, Рис. 14Б).

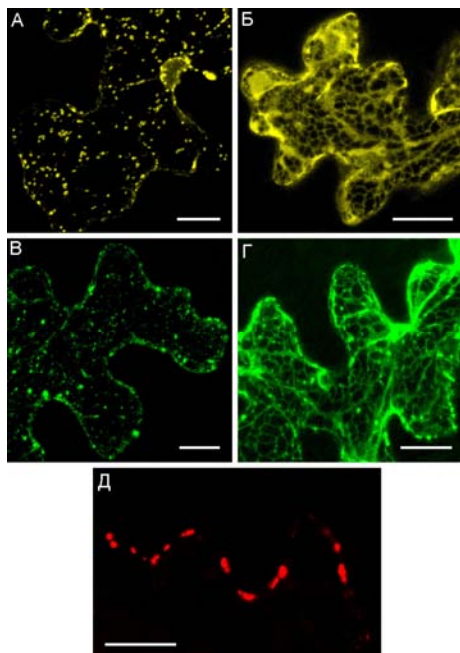


Рис. 14. Влияние экспрессии белка Sar1[T34N] на локализацию белков GFP-ТБГ3-мут62, GFP-ТБГ3-мут71 и DsRed-ТБГ3-мут71. Белки экспрессировали в листьях *N. benthamiana* с помощью бомбардировки. Изображения получены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа путем наложения серии оптических срезов. **А** – локализация белка ST-YFP. **Б** – локализация белка ST-YFP, ко-экспрессированного с белком Sar1[T34N]. **В** – локализация белка GFP-ТБГ3-мут62, ко-экспрессированного с белком Sar1[T34N]. **Г** – локализация белка GFP-ТБГ3-мут71, ко-экспрессированного с белком Sar1[T34N]. **Д** – локализация белка DsRed-ТБГ3-мут71, ко-экспрессированного с белком Sar1[T34N]. Масштабная линейка: 20 мкм.

Ранее было показано, что белки GFP-ТБГ3-мут71 и GFP-ТБГ3-мут62 локализуются в многочисленных мелких тельцах, часто образующих в цитоплазме гранулярную сеть (Solovyev *et al.*, 2000, Schepetilnikov *et al.*, 2008, Рис. 12А, Б). Блокирование СОРII-зависимого везикулярного транспорта с помощью Sar1[T34N] не оказывало заметного влияния на локализацию мутанта GFP-ТБГ3-мут62 (Рис. 14В), в то время как мутант GFP-

ТБГ3-мут71 при ко-экспрессии с Sar1[T34N] локализовался преимущественно в сети ЭПР (Рис. 14Г). Таким образом, хотя природа маленьких телец, в которых локализуется мутантный белок GFP-ТБГ3-мут71, неизвестна, можно предположить, что их образование происходит СОРП-зависимым путем и, следовательно, транспорт данного мутанта отклоняется от СОРП-независимого пути, характерного для белка ТБГ3 дикого типа.

Мы предположили, что образование белком ТБГ3 высокомолекулярных комплексов необходимо для его СОРП-независимого внутриклеточного транспорта. Для проверки этой гипотезы белок DsRed-ТБГ3-мут71, способный к образованию олигомерных комплексов за счет свойств белка DsRed, ко-экспрессировали с Sar1[T34N]. Было обнаружено, что Sar1[T34N] не влиял на транспорт белка DsRed-ТБГ3-мут71 в периферические мембранные тельца (Рис. 14Д). Таким образом, можно заключить, что образование белком ТБГ3 ПЛВМ высокомолекулярных комплексов необходимо для его транспорта СОРП-независимым путем.

Полученные в настоящей работе данные в целом согласуются с моделью внутриклеточного транспорта, согласно которой трансмембранные белки ТБГ2 и ТБГ3 образуют в мембранах ЭПР белковые «плоты», представляющие собой платформы, транспортирующие ВРНП-комплекс, включающий в себя белок ТБГ1 и вирусный геном, к ПД за счет латеральной диффузии в мембранах ЭПР (Epe1, 2009, Harries *et al.*, 2010, Tilsner *et al.*, 2011). Полученные нами данные показывают, что образование транспортных платформ зависит от способности белка ТБГ3 образовывать высокомолекулярные комплексы, в то время как их транспорт к периферическим компартментам клетки обеспечивается сигналом, находящимся в С-концевом трансмембранном домене белка ТБГ3.

Выводы

1. Показано, что белок ТБГ1 ВСВК, слитый с GFP, взаимодействует с МТ в отсутствие других вирусных продуктов. С помощью мутагенеза белка ТБГ1 картирован район, участвующий во взаимодействии с МТ.
2. Изучен внутриклеточный транспорт белка ТБГ1 ВСВК в присутствии белков ТБГ2 и ТБГ3. Показано, что белок ТБГ1, меняя внутриклеточную локализацию, последовательно (1) взаимодействует с МТ, (2) взаимодействует с МТ и локализуется в гранулярных структурах, связанных с МТ, и (3) теряет преимущественную ассоциацию с МТ и локализуется в дискретных структурах, связанных с клеточной стенкой, и в перинуклеарных включениях, сходных с агросомами.
3. Обнаружено, что структуры в клеточной стенке, в которые транспортируется белок ТБГ1 в присутствии белков ТБГ2 и ТБГ3, представляют собой внутренние области

плазмодесм. Доказано, что взаимодействие белка ТБГ1 с МТ необходимо для его ТБГ2/ТБГ3-зависимого транспорта в плазмодесмы.

4. Показано, что белок ТБГ3 ПЛВМ присутствует в инфицированной вирусом ткани в форме высокомолекулярных комплексов. Включение белка ТБГ3 в состав таких комплексов зависит от консервативной последовательности YQDLN в центральном районе белка. Доказано, что образование ТБГ3-содержащих высокомолекулярных комплексов является необходимым условием для СОП-независимого внутриклеточного транспорта белка ТБГ3 в периферические мембранные компартменты.

5. Показано, что сигнал внутриклеточного транспорта белка ТБГ3 ПЛВМ к периферическим мембранным структурам содержится в его С-концевом трансмембранном домене. Этот сигнал функционален при условии включения белка ТБГ3 в состав высокомолекулярных комплексов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Shemyakina, E.A., Solovyev, A.G., Leonova, O.G., Popenko, V.I., Schiemann, J. and Morozov, S.Yu. (2011). The role of microtubule association in plasmodesmal targeting of potato mop-top virus movement protein TGBp1. *The Open Virology Journal* **5**, 1-11.

2. Shemyakina, E.A., Erokhina, T.N., Gorshkova, E.N., Schiemann, J., Solovyev, A.G. and Morozov, S.Yu. (2011). Formation of protein complexes containing plant virus movement protein TGBp3 is necessary for its intracellular trafficking. *Biochimie* **93**, 742-748.

3. Шемякина Е.А. Роль микротрубочек в транспорте ТБГб1 вируса скручивания верхушек картофеля //XVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011» (11-15 апреля 2011): сб. тез. – Секция биология. – М., 2011. – С. 69-70.