

На правах рукописи

СЕМАШКО Мария Александровна

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ ТРАНСПОРТНОГО БЕЛКА ГОРДЕИВИРУСА В
ЯДРЫШКЕ И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С БЕЛКАМИ ЯДРЫШКА И
ТЕЛЕЦ КАХАЛЯ**

03.02.02 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва 2012

Работа выполнена на кафедре вирусологии биологического факультета и в отделе биохимии вирусов растений НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Калинина Наталья Олеговна

Официальные оппоненты:

Прасолов Владимир Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта РАН, заведующий отделом

Эльдаров Михаил Анатольевич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр «Биоинженерия» РАН, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена РАН

Защита состоится " 24 " мая 2012 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.76 по защите кандидатских и докторских диссертаций при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские Горы, МГУ, Биологический факультет, ауд. 389.

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

Автореферат разослан " ____ " апреля 2012 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Крашенинников И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одним из актуальных направлений молекулярной биологии вирусов является изучение функций клеточного ядра и субъядерных структур в процессе вирусной инфекции. Локализация вирусоспецифических белков и нуклеиновых кислот в клеточном ядре показана для вирусов человека, животных и растений (Hiscox, 2002; 2007; Greco, 2009, Taliansky et al., 2010). Для многих вирусов подобная локализация объясняется репликацией их геномов в ядре клетки с использованием аппарата репликации клеточной ДНК. Однако в настоящее время получены данные о том, что ядерные белки выполняют важные функции практически на всех этапах инфекционного цикла, начиная с проникновения вируса в клетку и заканчивая сборкой вирионов (Greco, 2009). Вместе с тем роль ядра в жизненном цикле РНК-содержащих вирусов с геномом положительной полярности, которые реплицируются и собираются в цитоплазме клетки и к числу которых относится большинство вирусов растений, долгое время оставалась неочевидной. Исследования последних лет показали, что вирусоспецифические белки этих вирусов также обнаруживаются в ядре. Эта стадия является необходимой для развития вирусной инфекции, в частности для реализации таких функций вирусов, как распространение (транспорт) вируса в растениях, репликация вирусного генома и подавление специфического защитного механизма растений - посттранскрипционного у молчания генов (Taliansky et al., 2010). Исследования молекулярных механизмов взаимодействия РНК-содержащих вирусов растений с ядром и субъядерными структурами позволяет не только выявить неизвестные аспекты взаимодействия вируса и клетки, но и в перспективе разработать новые стратегии защиты растений от вирусных инфекций.

Объектом данной работы является транспортный белок, кодируемый первым геном специального транспортного модуля - тройного блока генов (ТБГ), гордеивируса полулентного вируса мятлика (белок ТБГ1 ПЛВМ). Белок ТБГ1 гордеивирусов образует рибонуклеопротеидный (вРНП) комплекс с геномной и субгеномными РНК вируса для ближнего транспорта между соседними клетками растения и дальнего транспорта по проводящей системе растения флоэме. Два других транспортных белка ТБГ2 и ТБГ3 обеспечивают внутриклеточный транспорт вРНП-комплекса к плазмодесмам клеточной стенки (Jackson et al., 2009). Белок ТБГ1 ПЛВМ содержит протяженную N-концевую область и C-концевой НТФазный/хеликазный домен (HELD), который проявляет

НТФазную и РНК-хеликазную активности и кооперативно связывает РНК *in vitro* (Morozov and Solovyeu, 2003). N-концевая область состоит из двух структурно и функционально различающихся доменов, а именно полностью неупорядоченного NTD и внутреннего домена ID с преимущественно β -структурой и, видимо, выполняет основную роль в структурной организации ВРПП-комплекса (Makarov *et al.*, 2009, 2010). В составе NTD гордеивируса ПЛВМ выявлены два кластера положительно заряженных аминокислотных остатков, ответственных за некооперативное связывание с РНК и дальний транспорт вирусной инфекции (Kalinina *et al.*, 2001). О важной роли NTD в дальнем транспорте по флоэме вирусов с ТБГ гордеивирусного типа свидетельствуют данные, полученные на помовирусе скручивания верхушек картофеля (ВСВК). Делеция значительной части NTD белка ТБГ1 ВСВК сопровождается блокированием дальнего, но не ближнего транспорта вируса (Wright *et al.*, 2010). Дополнительно показано, что NTD отвечает за локализацию белка ТБГ1 ВСВК в ядре/ядрышке растительной клетки (Wright *et al.*, 2010).

Цель и задачи исследования

Цель данной работы состояла в изучении предполагаемой локализации белка ТБГ1 ПЛВМ в ядре/ядрышке клеток растений табака *Nicotiana benthamiana* и выявлении взаимодействия между белком ТБГ1 и основными белками ядрышка и телец Кахаля (ТК), субъядерной структуры, физически и функционально связанной с ядрышком.

В ходе работы решались следующие основные задачи:

1. Получение конструкции, содержащей ген белка ТБГ1 ПЛВМ, слитый с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP), и изучение локализации белка ТБГ1 в ядре клеток растений табака *Nicotiana benthamiana* в условиях временной экспрессии индивидуального белка с помощью системы агробактериальной инокуляции. Создание конструкций для экспрессии мутантных вариантов белка ТБГ1, слитых с GFP, и изучение их локализации в клетке.
2. Картирование участков в составе белка ТБГ1, необходимых для его локализации в ядре и ядрышке.
3. Изучение взаимодействия белка ТБГ1 с основным белком ядрышка фибрилларинном и с белком телец Кахаля коилином методами *in vitro* и *vivo*.

4. Идентификация участков взаимодействия между вирусным белком и белками ядрышка и телец Кахаля.

Научная новизна и практическая ценность работы

В ходе данной работы впервые показано, что транспортный белок ТБГ1 гордеивируса ПЛВМ, слитый с зеленым флуоресцентным белком, способен локализоваться в ядрышке эпидермальных клеток *N. benthamiana* при индивидуальной экспрессии (в отсутствии других вирусных белков). Участки белка ТБГ1, необходимые для его локализации в ядре и ядрышке (предполагаемые NLS и NoLS), выявлены в составе положительно заряженных кластеров неупорядоченного N-концевого домена белка ТБГ1 (NTD). Показано, что рекомбинантный белок ТБГ1 ПЛВМ способен взаимодействовать *in vitro* с белком ядрышка фибриларином (AtFib2 из *Arabidopsis thaliana*) и белком телец Кахаля коилином (Atcoilin из *Arabidopsis thaliana*). Определены участки, отвечающие за взаимодействия белков. С помощью метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации продемонстрировано взаимодействие вирусного белка и белков ядрышка и телец Кахаля *in vivo* и выявлена субклеточная локализация белковых комплексов в растительной клетке. В ходе исследования показано, что во взаимодействиях транспортного белка ТБГ1 и ядра определяющую роль играет неструктурированный домен NTD, в составе которого расположены как участки, необходимые для локализации вирусного белка в ядре/ядрышке, так и участки взаимодействия с фибриларином и коилином. Полученные результаты впервые на модели гордеивирусов демонстрируют связь между ядром клетки и цитоплазматическим РНК-содержащим гордеивирусом, свидетельствуя в пользу участия ядра/ядрышка в инфекции растений гордеивирусами. Высказано предположение о биологической роли локализации транспортного белка ТБГ1 в ядрышке клетки для осуществления дальнего транспорта гордеивируса.

Результаты работы могут быть использованы в практике научных исследований в области молекулярной биологии и вирусологии, а также при чтении курсов лекций по вирусологии на биологических факультетах высших учебных заведений.

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, на Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2008» (Москва, Россия, 2008), на семинаре Европейской Организации молекулярной биологии «Геномные подходы к взаимодействию вирусов растений, их хозяев и переносчиков» (Фенестрелле, Италия, 2010), на 35-ом Конгрессе Федерации Европейских биохимических обществ «Молекулы жизни» (Гетеборг, Швеция, 2010), на Международной конференции по сосудистой биологии растений (Колумбус, Огайо, США, 2010), на конференции Международных достижений растительной вирусологии (Амстердам, Нидерланды, 2010).

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 7 печатных работ, из них статьей в реферируемых отечественном и международном журналах – 2, материалов международных конференций - 5.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 102 страницах, содержит 21 рисунок, 4 таблицы и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение результатов», «Выводы» и «Список цитируемой литературы» (191 цитируемая работа).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Белок ТБГ1 ПЛВМ локализуется в ядрышках эпидермальных клеток растений *N. benthamiana*.

Для изучения внутриклеточной локализации белка ТБГ1 ПЛВМ (белок с молекулярной массой 63 кДа или белок 63К) в отсутствие вирусной инфекции листья табака *N. benthamiana* агроинфильтрировали полученной конструкцией GFP-63К, несущей ген белка ТБГ1, слитый с геном зеленого флуоресцентного белка (*GFP*). Флуоресценцию в эпидермальных клетках анализировали методом конфокальной лазерной сканирующей

микроскопии (КЛСМ) на 3-4 день после инфильтрации. Диффузная флуоресценция в основном обнаруживалась в цитозоле клеток, видимо, в ассоциации с эндоплазматическим ретикулумом и/или микротрубочками, что согласуется с показанной ранее локализацией GFP-ТБГ1 гордеивируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) и GFP-ТБГ1 ВСКВ (Lawrence & Jackson, 2001; Lim *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2010; Shemyakina *et al.*, 2011) (Рис. 1А). Кроме того, слабая флуоресценция была выявлена в ядре, где она аккумулировалась в структурах, напоминающих ядрышко. Действительно, когда GFP-63К ко-экспрессировали с маркером ядрышка фибрилларин (Fib), слитым с мономерным красным флуоресцирующим белком (mRFP) (конструкция mRFP-Fib), оба белка ко-локализовались в ядрышке (Рис. 1В). Известно, что индивидуально экспрессируемый GFP локализуется в цитоплазме и в ядре, но не ядрышке (данные не показаны). Для подтверждения полученных данных была сделана конструкция, где ген белка ТБГ1 ПЛВМ был слит с геном *GFP* в противоположной ориентации (конструкция 63К-GFP). В этом случае флуоресценция обнаруживалась также в цитозоле эпидермальной клетки и в ядрышке (Рис. 1Б).

Таким образом, белок ТБГ1 ПЛВМ, экспрессированный в отсутствие других вирусных белков, локализуется преимущественно в цитозоле, но некоторое количество белка обнаруживается в ядрышке клетки. Расположение GFP с N- или С-конца белка ТБГ1 не влияет на внутриклеточное распределение флуоресценции. Присутствие белка ТБГ1 ПЛВМ в ядрышке не может быть объяснено неспецифической диффузией белка, т.к. большая молекулярная масса слитого белка GFP-ТБГ1 (примерно 90 кДа) превышает предел для пассивной диффузии белков в ядро (40-60 кДа) (Nigg, 1997).

Полученные результаты согласуются с данными биоинформатического анализа аминокислотной последовательности белка ТБГ1. Сервер PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) предсказывает ядерную локализацию белка.

Потенциальный сигнал ядерной локализации (NLS) предсказывается программой PredictNLS (<http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl>.) в N-концевом домене (NTD) в участке, включающем аминокислотные остатки с 119 по 154 (Рис. 2А, Б).

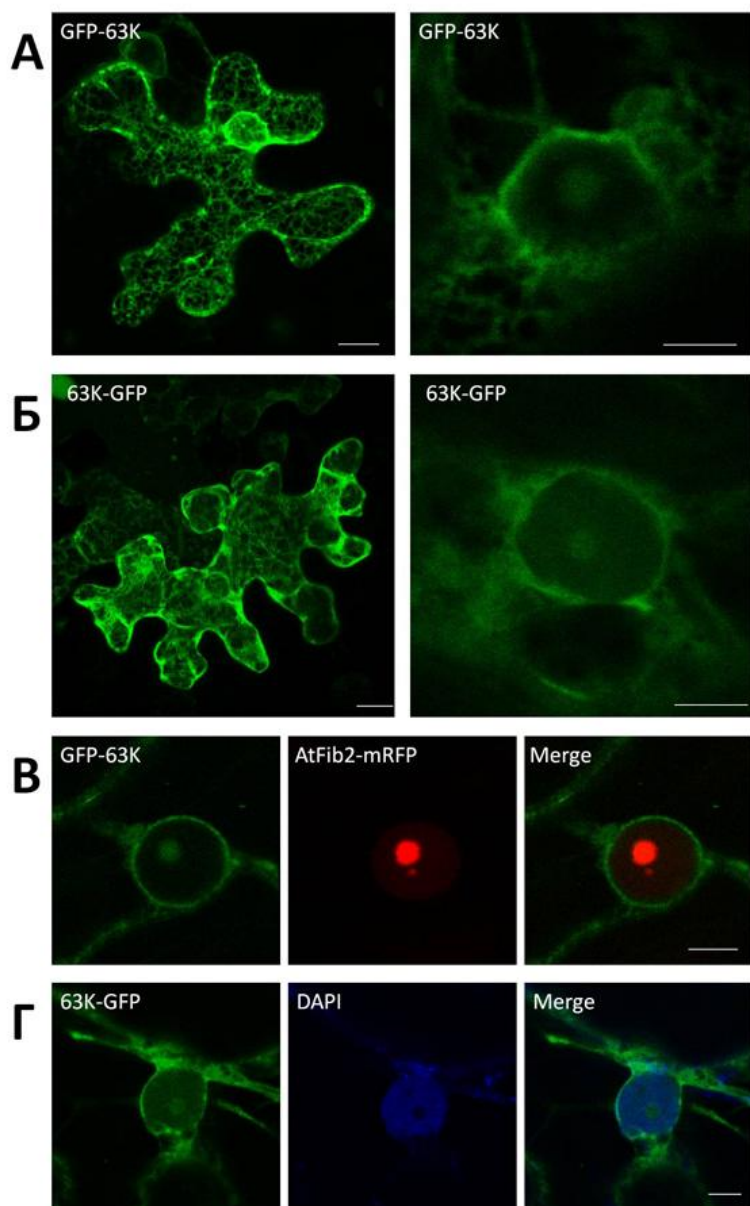


Рис. 1. Внутриклеточная локализация белка ТБГ1 ПЛВМ (белка 63К), слитого с GFP, при агроинfiltrации листьев *N. benthamiana* соответствующими конструкциями. А – локализация белка GFP-63К, эпидермальная клетка и ядро. Б – локализация белка 63К-GFP, эпидермальная клетка и ядро; В-Г - изображения ядер, В – ко-экспрессия GFP-63К и mRFP-фибрилларина, маркера ядрышка и телец Кахаля; сигнал GFP показан слева, сигнал mRFP в центре и наложение изображений - справа; Г – ко-экспрессия 63К-GFP с нефлуоресцирующим фибрилларинном, сигнал GFP показан слева, окраска ядра DAPI – в центре, совмещенное изображение ядер - справа. Изображения получены наложением серии конфокальных оптических срезов. Масштабная линейка: 10 мкм (А и Б, левое изображение) и 5 мкм (все остальные изображения).

N-концевой домен белка ТБГ1 ПЛВМ отвечает за его локализацию в ядрышке

В следующей серии экспериментов была изучена внутриклеточная локализация делеционных мутантов белка ТБГ1. Для этого были получены делеционные мутанты, соответствующие *N*-концевой половине белка (N63К), *C*-концевому НТФазно/хеликазному домену (С63К) и домену NTD, слитые с GFP (Рис 2А). Конструкция GFP-N63К оказалась нестабильной в растительной клетке. По данным Вестерн блот анализа с антителами к GFP и к полноразмерному белку ТБГ1 продукт,

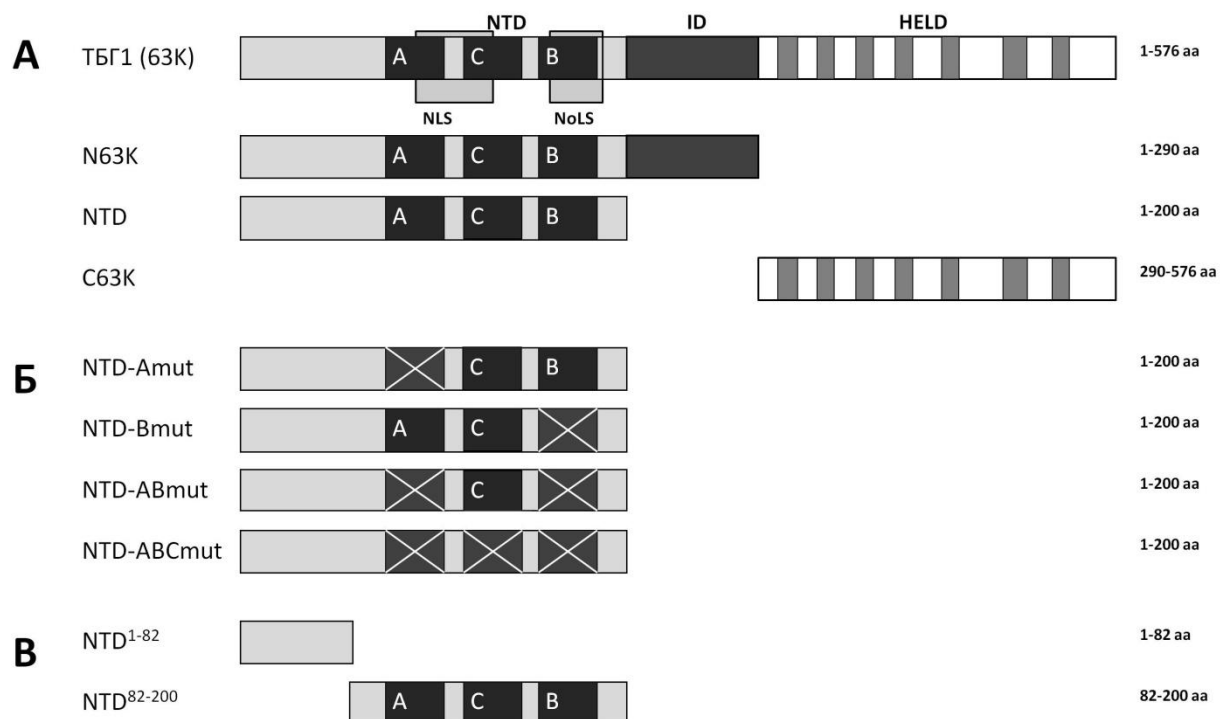


Рис. 2. Схематическое изображение белка ТБГ1 ПЛВМ (белка 63К) и его мутантов. А – Показаны основные домены белка ТБГ1 ПЛВМ: N-концевой домен (NTD), центральный или внутренний домен (ID) и C-концевой НТФазный/хеликазный домен (HELD). Консервативные мотивы суперсемейства 1 НТФаз/хеликаз показаны как прямоугольники темно-серого цвета. Черные прямоугольники обозначают положительно заряженные кластеры А, В и С. Положение предсказанного NLS и предполагаемого NoLS обведено контуром. Делеционные мутанты обозначены как N63K (N-концевая область), NTD (N-концевой домен) и C63K (C-концевой НТФазный/хеликазный домен, HELD). Б – Точечные мутанты NTD: кластеры А, В и С, в которых положительно заряженные аминокислотные остатки аргинина и лизина заменены на нейтральные остатки аланина, показаны перечеркнутыми. Положительно заряженные кластеры А и В были мутированы отдельно (NTD-Amut и NTD-Bmut). Одновременно мутировали кластеры А и В (NTD-ABmut) и А, В, С (NTD-ABCmut). В – Делеционные мутанты NTD: мутант NTD¹⁻⁸², содержащий аминокислотные остатки с 1 по 82, и мутант NTD⁸²⁻²⁰⁰, содержащий аминокислотные остатки с 82 по 200. Аминокислотные остатки, входящие в состав полноразмерного белка ТБГ1 и его мутантов указаны справа.

образующийся при экспрессии этой конструкции, деградировал в клетке, образуя фрагмент, состоящий из GFP, слитого с последовательностью N-конца N63K с молекулярной массой около 35 кДа. Наблюдаемый характер распределения флуоресценции в целом соответствовал флуоресценции свободного GFP: продукт деградации локализовался в ядре, но не в ядрышке и в цитоплазме, в том числе во включениях различного размера (данные не показаны).

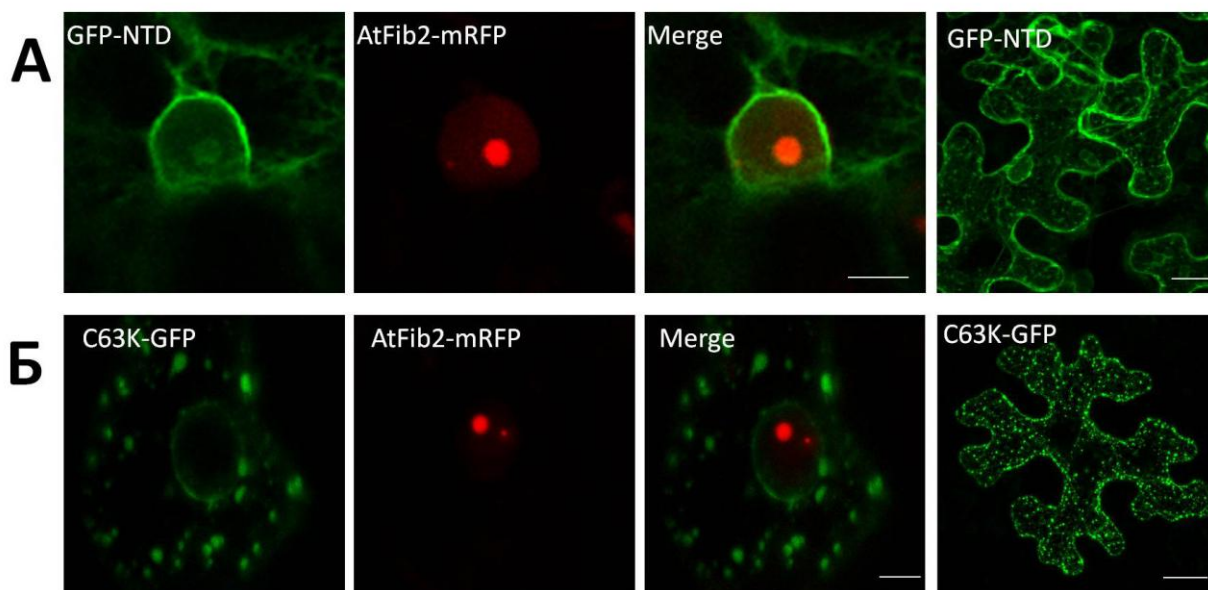


Рис. 3. Субклеточная локализация делеционных мутантов белка ТБГ1 ПЛВМ, слитых с GFP, экспрессированных при агроинfiltrации листьев *N.benthamiana*. А – ко-экспрессия GFP-NTD и mRFP-фибрилларина, сигнал GFP показан слева, далее показаны сигнал mRFP и наложение изображений; справа показан общий план клеток; Б – ко-экспрессия С63К-GFP и mRFP-фибрилларина, сигнал GFP показан слева, далее показаны сигнал mRFP и наложение изображений; справа показан общий план клеток. Изображения получены наложением серии конфокальных оптических срезов. Масштабная линейка: 20 мкм для крайних правых изображений и 5 мкм для всех остальных.

При агроинfiltrации конструкции GFP-NTD, совместно с фибрилларинном, слитым с mRFP, флуоресценция выявлялась в ядрышке, а также в цитоплазме клетки (Рис. 3А). В целом распределение флуоресценции было сходно с наблюдаемой для полноразмерного белка. Напротив, при экспрессии конструкции С63К-GFP НТФазно/хеликазный домен белка ТБГ1 локализовался только в цитоплазме в виде гранул. Флуоресценция не обнаруживалась ни в ядре, ни в ядрышке, которое визуализировалось при ко-экспрессии mRFP-фибрилларина (Рис. 3Б). Таким образом, эти результаты свидетельствуют о том, что сигнал локализации белка ТБГ1 в ядре/ядрышке расположен в домене NTD.

Картирование сигнала ядерной локализации в кластере А домена NTD.

Мотивы, богатые положительно заряженными аминокислотами аргинином и лизином, способны функционировать как сигналы ядерной локализации (NLS), формируя одночастные NLS, состоящие из одного кластера положительно заряженных аминокислот (NLS класса 1) или двухчастные, состоящие из двух кластеров, разделенных 10-12-членным аминокислотным линкером (NLS класса 2) (Lange *et al.*, 2007; Kosugi *et al.*,

2009). N-концевой домен белка ТБГ1 ПЛВМ богат такими мотивами: он содержит несколько положительно заряженных кластеров, в том числе РНК-связывающие кластеры А и В (Kalinina *et al.*, 2001). Предсказанная последовательность NLS (119-154 aa остатки) находится в домене NTD и частично перекрывается с кластером А и кластером С (Рис. 2А).

Для картирования NLS были сконструированы четыре точечных мутанта NTD (Рис. 2Б), слитые с GFP: GFP-NTD-Amut, GFP-NTD-Bmut, GFP-NTD-ABmut и GFP-NTD-ABCmut. Кластер А (114-125 aa) содержит 9 остатков лизина и аргинина; кластер В (175-190 aa) содержит 8 остатков лизина; кластер С (147-156 aa) содержит 5 остатков лизина. Положительно заряженные кластеры А и В (конструкции NTD-Amut и NTD-Bmut) были мутированы отдельно. Одновременно были мутированы кластеры А и В и кластеры А, В и С (конструкции NTD-ABmut и NTD-ABCmut соответственно). В NTD были внесены следующие мутации (положительно заряженные аминокислоты, которые были заменены, обозначены жирным шрифтом): в GFP-NTD-Amut исходная последовательность ¹¹⁴КАКСКРКККНKK¹²⁵ была заменена на ¹¹⁴КААСNGALKNAA¹²⁵; в GFP-NTD-Bmut исходная последовательность ¹⁷⁵KKATKKESKKQTKDKG¹⁹⁰ была заменена на ¹⁷⁵АЕАТТНАСААQТЕДКG¹⁹⁰; в GFP-NTD-ABmut были внесены обе эти мутации, и в GFP-NTD-ABCmut кроме указанных выше мутаций в кластерах А и В исходная последовательность кластера С ¹⁴⁷KESKKQTKPK¹⁵⁶ была заменена на ¹⁴⁷АЕСАLQTLPA¹⁵⁶. Мутации в кластерах А и В были аналогичны тем, которые были сделаны ранее в составе N-концевой половины белка ТБГ1 ПЛВМ для изучения ее РНК-связывающих свойств (Kalinina *et al.*, 2001). Конструкции были экспрессированы в листьях *N. benthamiana* с помощью агроинфильтрации. Флуоресценция GFP-NTD обнаруживается в ядрышке клетки (Рис. 3А). Локализация GFP-NTD-Amut в ядре и ядрышке не выявляется (Рис. 4А). Присутствие в ядре/ядрышке также не выявлено для мутантов GFP-NTD-ABmut и GFP-NTD-ABCmut (Рис. 4В и Г). Фоновая флуоресценция мутантных белков в нуклеоплазме может быть обусловлена неспецифической диффузией «слитых» белков, молекулярная масса которых (45-50 кДа) меньше или соответствует молекулярной массе белков, способных попадать в ядро за счет простой диффузии (40-60 кДа). Напротив, мутант GFP-NTD-Bmut распределяется равномерно в нуклеоплазме, но практически отсутствует в ядрышке (Рис. 4Б). Экстракты листьев были проанализированы Вестерн блот анализом с использованием антител к белку ТБГ1 и GFP и подтвердили

отсутствие деградации «слитых» мутантных белков в растительной клетке (данные не показаны).

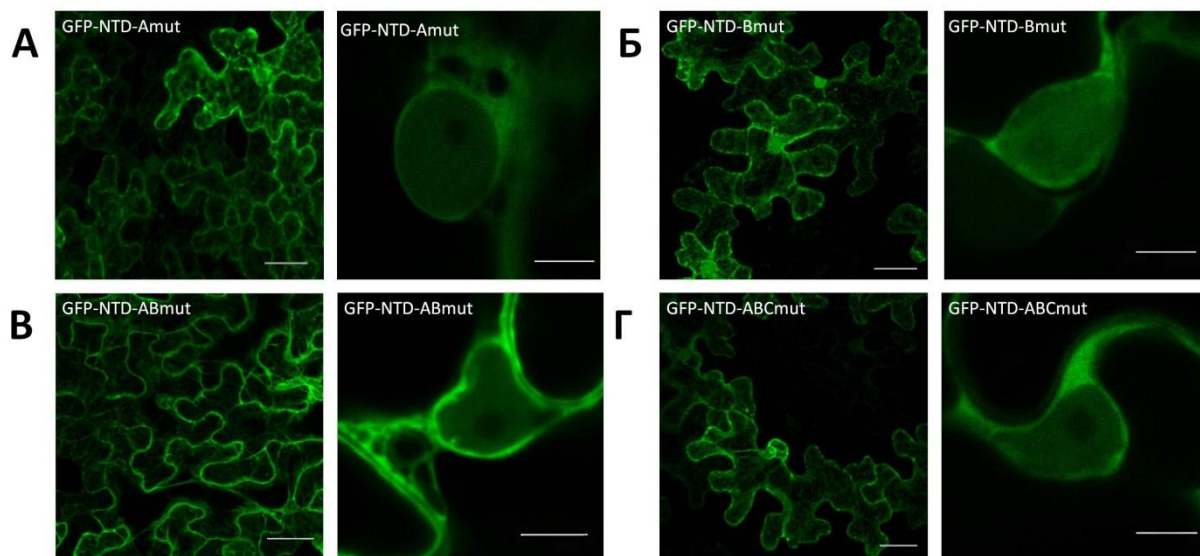


Рис. 4. Локализация в ядре мутантов NTD по положительно заряженным кластерам, слитых с GFP. Изображения общего плана клетки (слева) и ядер (справа), полученные КЛСМ листьев на 3-4 дни после агроинфильтрации листьев *N. benthamiana* конструкциями, экспрессирующими: А – GFP-NTD-Amut, Б - GFP-NTD-Bmut, В - GFP-NTD-ABmut, Г - GFP-NTD-ABCmut. Изображения получены наложением серии конфокальных оптических срезов. Масштабная линейка: 5 мкм ядра и 20 мкм эпидермальные клетки.

В связи с тем, что мутации в кластере А отменяют локализацию NTD в ядре/ядрышке, предположено, что необходимая для ядерной локализации белка ТБГ1 последовательность расположена в кластере А в составе последовательности $^{116}\text{KSKRKKKNKK}^{125}$. Интересно, что правая часть этой последовательности напоминает классический одночастный NLS (К(К/Р)Х(К/Р), взаимодействующий с импортином α (Hodel *et al.*, 2001; Rajamaki & Valkonen, 2009), который опосредует ядерный импорт белков по импортину α/β пути. Мутации в кластере В отменяют локализацию NTD в ядрышке: мутантный белок преимущественно локализуется в нуклеоплазме. Таким образом, весьма вероятно, что последовательность $^{175}\text{KKATKKESKKQTK}^{187}$ необходима для локализации белка в ядрышке и содержит NoLS.

Полученные результаты являются вторым сообщением о присутствии в ядрышке белка ТБГ1, кодируемого вирусом, содержащим ТБГ гордеивирусного типа. Недавно было показано, что белок ТБГ1 помовируса ВСВК локализуется в ядре/ядрышке (Wright *et al.*, 2010). Интересно, что сигнал/сигналы, отвечающие за ядрышковую локализацию,

расположены в составе доменов NTD белков ТБГ1 обоих вирусов. Показано, что NTD ВСВК, слитый с GFP, локализуется в ядре/ядрышке, а белок ТБГ1 ВСВК с делецией NTD нет. Авторы предположили, что два мотива положительно заряженных аминокислотных остатков в составе NTD могут функционировать как сигналы локализации в ядре и ядрышке (Wright et al., 2010). Таким образом, полученные нами данные согласуются с результатами, полученными для белка ТБГ1 ВСВК, и локализуют вероятные NLS и NoLS мотивы в составе домена NTD.

GAR домен фибрилларина взаимодействует с NTD белка ТБГ1 ПЛВМ in vitro.

Вирусоспецифические белки некоторых вирусов растений взаимодействуют с основным белком ядрышка, фибриларином, и это взаимодействие необходимо для успешного инфекционного цикла (Taliensky et al., 2010). В экспериментах, описанных выше, было продемонстрировано, что белок ТБГ1 ПЛВМ ко-локализуется с фибриларином при агроинфильтрации листьев растений табака *N. benthamiana* конструкциями, экспрессирующими GFP-63К и mRFP-AtFib2. Кроме того, наши предварительные данные указывали на то, что флуоресценция GFP-63К становится более интенсивной, при ко-экспрессии GFP-ТБГ1 и фибрилларина. Прямое взаимодействие между фибриларином и белком ТБГ1 ПЛВМ было изучено *in vitro* методом Фар-Вестерн анализа. Рекомбинантный полноразмерный белок ТБГ1 и его делеционные и точечные мутанты были экспрессированы в *E. coli*, очищены аффинной хроматографией в денатурирующих условиях и ренатурированы. Для анализа белок-белковых взаимодействий рекомбинантный фибрилларин (*Arabidopsis fibrillarin 2*, AtFib2) и его мутант с делецией глицин-аргинин богатого N-концевого домена (GAR-домена), слитый на N-конце с глутатион-S-трансферазой (GST-FibΔGAR), переносили на нитроцеллюлозную мембрану после фракционирования методом ЭФ в ДДС-ПААГ, ренатурировали и инкубировали с полноразмерным белком ТБГ1 или его делеционными мутантами. Взаимодействие между белками выявляли с использованием поликлональных антител против белка ТБГ1 ПЛВМ или его N-концевой половины. Белок His6-AtFib2 (около 35 кДа) связывается с белком ТБГ1 ПЛВМ. В отличие от него белок GST-FibΔGAR не способен взаимодействовать с белком ТБГ1 ПЛВМ. Взаимодействия между GST и белком ТБГ1 обнаружено не было (данные не показаны). Эти результаты демонстрируют, что белок ТБГ1 способен прямо взаимодействовать с фибриларином *in vitro*, и что N-концевой GAR-домен фибрилларина необходим для этого взаимодействия. Известно, что

GAR-домен фибрилларина отвечает за взаимодействие с транспортным белком ORF3 умбравируса (Kim *et al.*, 2007b). Для выявления участков в составе белка ТБГ1, отвечающих за взаимодействие с фибрилларинном, первоначально проверяли делеционные мутанты, соответствующие N- и C-концевым половинам белка ТБГ1 – N63K и С63K, соответственно. Данный эксперимент демонстрирует, что с фибрилларинном взаимодействует N63K, но не С63K (Рис. 5). В составе N-концевой половины белка ТБГ1 с полноразмерным фибрилларинном связывается домен NTD. Таким образом, опытами *in vitro* показано, что N-концевой домен (NTD) транспортного белка ТБГ1 гордеивируса взаимодействует с GAR-доменом фибрилларина.

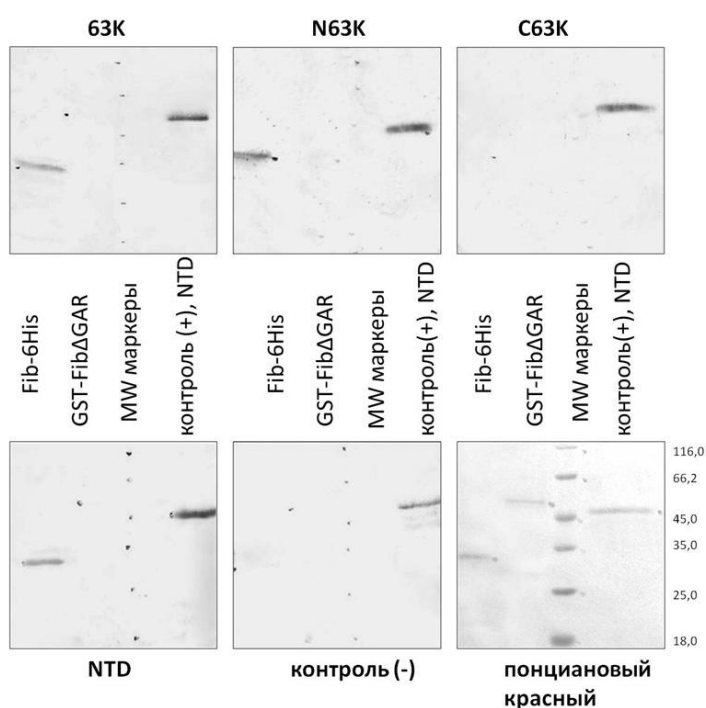


Рис. 5. Фар-Вестерн анализ взаимодействия белка ТБГ1 ПЛВМ и его делеционных мутантов с фибрилларинном. AtFib2-6His (дорожка 1), GST-AtFib2ΔGAR (дорожка 2), маркеры молекулярного веса (дорожка 3) и NTD (положительный контроль, дорожка 4), перенесенные на НЦ после ЭФ в ДДС-ПААГ, инкубировали с полноразмерным белком ТБГ1 (белок 63К) и его делеционными мутантами N63К, С63К и NTD или в отсутствии белка (отрицательный контроль) и выявляли белок-белковое взаимодействие антителами к полноразмерному белку ТБГ1. На правом нижнем блоке показана окраска белков понциановым красным (Ponceau S) и положение маркеров молекулярной массы.

Визуализация взаимодействия белка ТБГ1 и фибрилларина *in vivo* методом бимолекулярной флуоресцентной комплементации (БиФК).

Для подтверждения взаимодействия между белком ТБГ1 и фибрилларинном *in vivo* был использован метод бимолекулярной флуоресцентной комплементации (БиФК). Принцип метода заключается в том, что предположительно взаимодействующие друг с другом белки «сшиваются» с нефлуоресцирующими половинами желтого флуоресцентного белка (YFP) - sYFPN и sYFPC, соответственно. Взаимодействие слитых белков при ко-экспрессии конструкций в клетках растения сопровождается восстановлением флуорофора YFP и соответственно появлением флуоресценции YFP.

Конструкции, содержащие ген фибрилларина из *N. benthamiana*, слитые с различными половинами гена *YFP* - sYFPN и sYFPC, соответственно, экспрессировали в листьях *N. benthamiana* и анализировали КЛСМ на третий день после инфильтрации. В листьях, инфильтрованных этими конструкциями, наблюдалась интенсивная флуоресценция, аккумулированная в ядрышках и тельцах Кахаля, что полностью соответствует локализации нативного фибрилларина (Рис. 6А). Флуоресценция не выявлялась при ко-экспрессии отдельных половин *YFP* - sYFPN и sYFPC (данные не показаны).

При ко-экспрессии конструкций sYFPN-63К и sYFPC-63К флуоресценция *YFP* распределялась в цитоплазме клетки в виде включений различного размера. Флуоресценция внутри ядра отсутствовала. (Рис. 6Б). Эти результаты подтвердили ранее полученные биохимические данные о способности белка ТБГ1 ПЛВМ к гомологическим взаимодействиям (Lechshiner et al., 2006; Makarov et al., 2009). Однако характер распределения флуоресценции отличался от данных, полученных при экспрессии конструкций GFP-63К или 63К-GFP. Наблюдаемые различия могут объясняться особенностями метода БиФК. Известно, что взаимодействие между молекулами белков, связанными с половинами *YFP*, приводит к образованию стабильных белковых комплексов. Восстановление флуорофора *YFP* носит практически необратимый характер, что делает метод БиФК непригодным для мониторинга динамического взаимодействия молекул (Tilsner and Oparka, 2010). В случае ко-инфильтрации вектора, содержащего конструкцию sYFPN-63К с вектором, экспрессирующим только sYFPC, а также вектора, содержащего sYFPC-63К с вектором, экспрессирующим sYFPN, флуоресценция в клетках полностью отсутствует (данные не показаны).

Визуализацию взаимодействия между белком ТБГ1 ПЛВМ и фибрилларинном в клетках *N. benthamiana*, также проводили методом БиФК. При агроинфильтрации бинарных векторов, экспрессирующих sYFPC-63К и sYFPN-Fib, в листья *N. benthamiana* заметная флуоресценция наблюдалась в ядрышке и тельцах Кахаля. Флуоресценция также выявлялась и в цитоплазме в виде включений различного размера (Рис. 6В). Аналогичное распределение флуоресценции в клетке наблюдалось и в случае ко-экспрессии N-концевой половины белка ТБГ1 (длиной 290 аа остатков), слитой с половиной sYFPC, и sYFPN-Fib – вирусный и клеточный белки взаимодействовали в ядрышках, тельцах Кахаля и цитоплазме (Рис. 6Г). При ко-экспрессии sYFPC-NTD и sYFPN-Fib флуоресценция была зафиксирована только в ядрышках одиночных клеток, что, очевидно, обусловлено низкой экспрессией белка (Рис. 6Д). Вестерн блот анализ инфильтрованных листьев подтвердил накопление в листьях белков, слитых с

половинами YFP (данные не показаны). При ко-инfiltrации конструкций sYFPC-C63K и sYFPN-Fib флуоресценции выявлено не было, что согласуется с отсутствием взаимодействия между С-концевым доменом белка ТБГ1 и фибрилларинном *in vitro* (Рис. 6Е).

Таким образом, и предполагаемые NLS/NoLS, и участок связывания фибрилларина находятся в N-концевом домене NTD белка ТБГ1. Данные, полученные методом БиФК, также показывают, что взаимодействие между вирусным транспортным белком ТБГ1 и фибрилларинном происходит не только в ядрышках и тельцах Кахаля, но и в цитоплазме. Последнее может означать, что либо белки взаимодействуют в местах их синтеза, либо фибрилларин может ре-локализоваться в комплексе с белком ТБГ1 из ядрышка в цитоплазму.

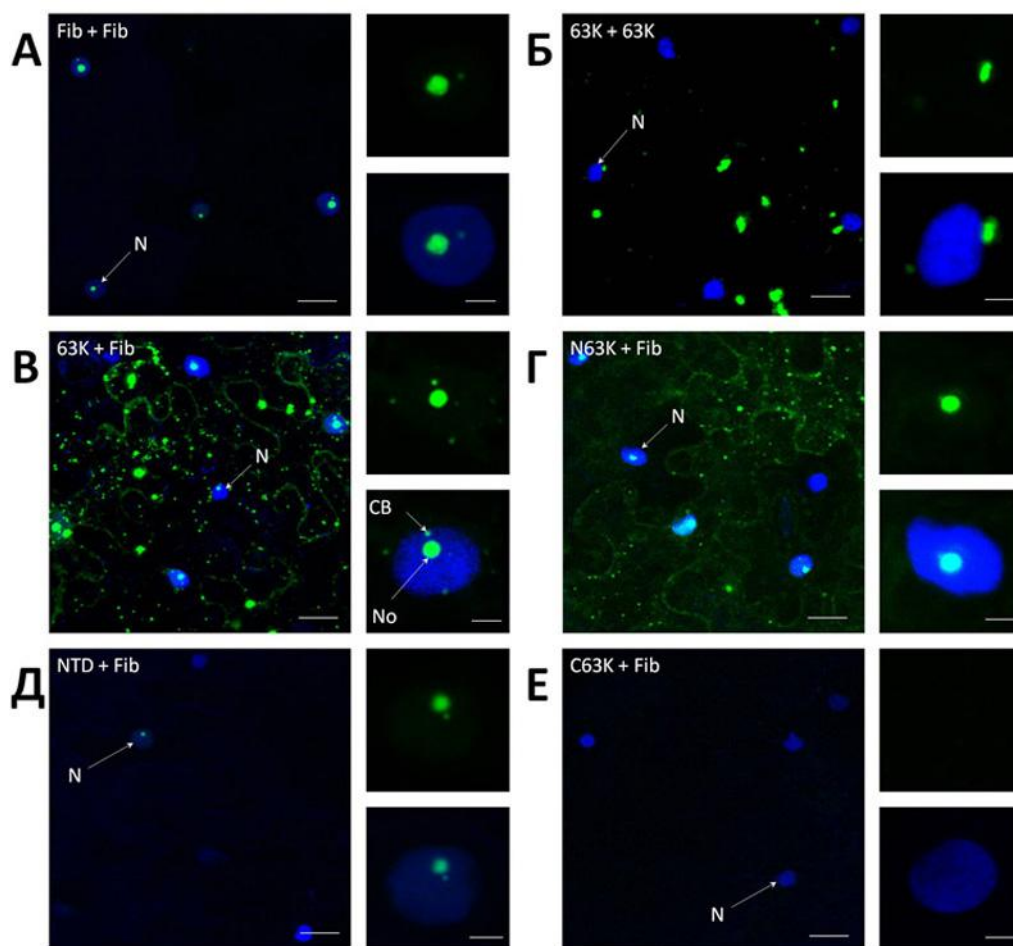


Рис. 6. Визуализация белок-белковых взаимодействий *in vivo* методом бимолекулярной флуоресцентной комплементации. А – флуоресценция, детектированная КЛСМ на 3 день после infiltration листьев *N. benthamiana*, конструкциями, которые экспрессировали фибрилларин, слитый на N-конце с различными половинами желтого флуоресцирующего белка (YFP) (sYFPN-Fib и sYFPC-Fib) и окраска DAPI. Б – sYFPN-63K и sYFPC-63K - флуоресценция и окраска DAPI. В – sYFPN-63K и sYFPC-Fib - флуоресценция и окраска DAPI. Г – sYFPN-N63K и sYFPC-Fib - флуоресценция и окраска DAPI, Д – sYFPN-NTD и sYFPC-Fib флуоресценция и окраска DAPI, Е –

sYFPN-C63K и sYFPC-Fib - окраска DAPI. Во вставках показаны отдельные ядра (флуоресценция) и наложение изображений флуоресценции и окраски DAPI. Ядра (N), ядрышки (No) и тельца Кахаля (CB) отмечены стрелками. Масштабная линейка - 5 мкм для ядер и 20 мкм для общего плана.

N-концевой домен белка ТБГ1 отвечает за взаимодействие с фибрилларинном.

Картирование участка связывания фибрилларина с NTD проводили с помощью описанных ранее мутантов NTD (NTD-Amut, NTD-Bmut, NTD-ABmut, NTD-ABCmut) (Рис. 2Б), которые были экспрессированы в *E. coli* как рекомбинантные белки, содержащие последовательность из шести остатков гистидина (His₆) на N-конце для выделения с помощью аффинной хроматографии. Белок-белковые взаимодействия изучали ранее описанным Фар-Вестерн методом. На рис. 7А показано, что мутанты с заменами положительно заряженных аминокислотных остатков нейтральными взаимодействуют с фибрилларинном так же, как и NTD дикого типа. (Рис. 7А). Таким образом, замена остатков лизина и аргинина на аланин не влияет на взаимодействия между доменом NTD и фибрилларинном. Эти результаты позволяют предположить, что участок взаимодействия с фибрилларинном расположен за пределами положительно заряженных кластеров.

Недавно в нашей лаборатории было показано, что NTD - это полностью неупорядоченный домен (Makarov *et al.*, 2009; 2011). NTD состоит из протяженной N-концевой области (1-82 aa) с теоретически рассчитанной изоэлектрической точкой pI 4,62, за которой следуют чередующиеся положительно и отрицательно заряженные участки длиной 14-16 aa остатков. Теоретические изоэлектрические точки для этих участков составляют: pI 9,53 для 82-97 aa; pI 4,31 для 98-113 aa; pI 10,87 для 114-129 aa (кластер А); pI 6,28 для 130-145 aa; pI 10,18 для 146-161 aa (кластер С); pI 4,37 для 162-175 aa и pI 10,22 для 176-190 aa (кластер В) (Makarov *et al.*, 2011). Таким образом, отрицательно заряженный участок может отвечать за взаимодействие белка ТБГ1 с фибрилларинном. Для проверки этого предположения были сконструированы два дополнительных мутанта NTD: мутантный белок, содержащий аминокислотные остатки с 1 по 82 (мутант NTD¹⁻⁸²), и мутантный белок, содержащий аминокислотные остатки с 82 по 200 (мутант NTD⁸²⁻²⁰⁰) (Рис. 3В). Фар-Вестерн анализ показал, что только мутант NTD¹⁻⁸² связывается с фибрилларинном (Рис. 7Б). Интересно, что теоретически рассчитанная pI GAR-домена фибрилларина составляет 12,4. Таким образом, возможно, имеет место

электростатическое взаимодействие между положительно заряженным GAR-доменом фибрилларина и отрицательно заряженной областью NTD белка ТБГ1.

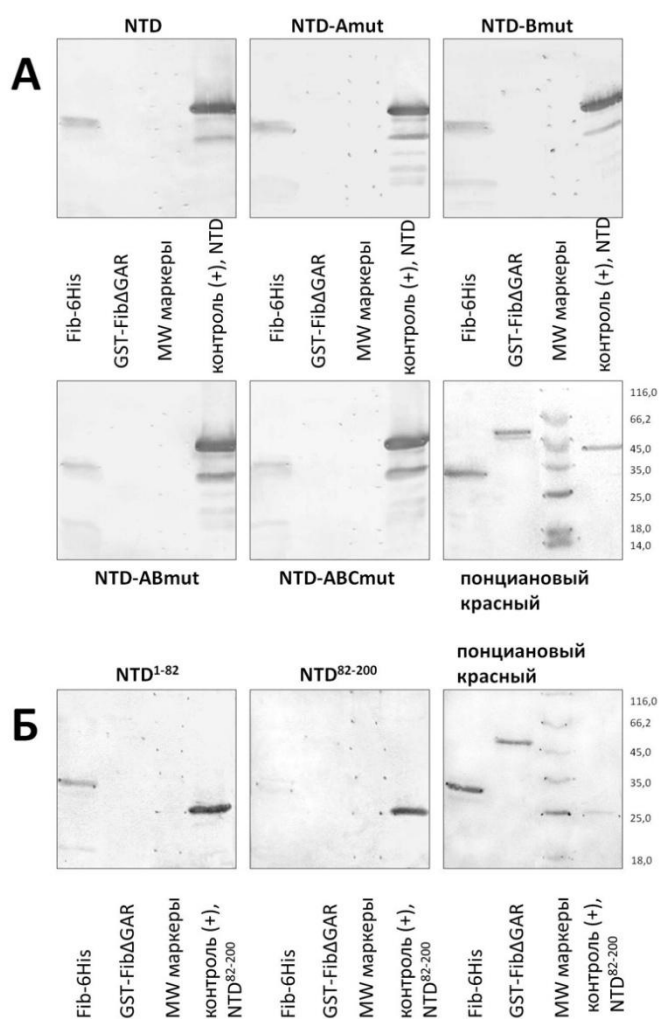


Рис. 7. Картирование участка NTD, взаимодействующего с фибрилларинном *in vitro* методом Фар-Вестерн анализа. А – AtFib2 (дорожка 1), GST-AtFib2ΔGAR (дорожка 2), маркеры молекулярного веса (дорожка 3) и NTD (положительный контроль, дорожка 4), перенесенные на НЦ после ЭФ в ДДС-ПААГ инкубировали с NTD и его мутантами по положительно заряженным кластерам - кластер А (NTD-Amut), кластер В (NTD-Bmut), кластеры А и В (NTD-ABmut) и кластеры А,В и С (NTD-ABCmut) и выявляли белок-белковое взаимодействие антителами к полноразмерному белку ТБГ1. На правом нижнем блоте показана окраска белков понциановым красным (Ponseau S) и положение маркеров молекулярной массы. Б – блоты, содержащие те же белки, что и в (А) инкубировали с делеционными мутантами NTD – NTD¹⁻⁸² и NTD⁸²⁻²⁰⁰ и антителами к белку ТБГ1. На правом нижнем блоте показана окраска белков понциановым красным (Ponseau S) и положение маркеров молекулярной массы. Мутант NTD⁸²⁻²⁰⁰ использован как положительный контроль.

Вирусные белки ряда вирусов растений не только ко-локализуются в ядрышках с их главным белком фибрилларинном но и способны прямо взаимодействовать с этим белком ядрышка (Talianky et al., 2010). Это взаимодействие требуется для реализации различных функций вируса: так фибрилларин совместно с транспортным белком умбравируса ORF3 принимает участие в образовании вирусных цитоплазматических РНП-частиц для дальнего транспорта вируса (Kim et al., 2007a; 2007b), вместе с белком VPg потивируса требуется для репликации вирусной РНК и/или супрессии посттранскрипционного умолкания генов (Rajamaki & Valkonen, 2009). Предположено, что взаимодействие с фибрилларинном может быть общим свойством белков вирусов растений из различных таксономических групп. Полученные нами данные о

взаимодействии транспортного белка ТБГ1 горлевируса и фибрилларина свидетельствуют в пользу этого предположения.

Транспортный белок ТБГ1 ПЛВМ способен взаимодействовать с коилином *in vitro*.

Кластер A NTD отвечает за связывание с коилином

На рис. 6В видно, что наряду с ядрышками, белок ТБГ1 ПЛВМ локализуется и в тельцах Кахаля, субъядерных структурах, которые обнаруживаются в ядрах клеток многих представителей эукариот и в том числе в ядрах клеток растений и физически и функционально связаны с ядрышками. ТК принимают участие в процессах сборки, модификации и транспорта ряда РНК-белковых комплексов, включая малые ядерные рибонуклеопротеидные комплексы, контролирующие сплайсинг РНК (Cioce and Lamond, 2005). Предполагается, что наряду с ядрышками ТК участвуют в регуляции клеточного цикла и развития, а также в ответе на стресс различного происхождения (Cioce and Lamond, 2005; Boulon *et al.*, 2010). Известно, что ядро и ядрышко играют важную роль в процессе вирусной инфекции. Роль ТК в этих процессах остается мало изученной и ограничена несколькими примерами. Показано, что при заражении клеток вирусами герпеса простого тип 1 и аденовирусом происходит перераспределение коилина и некоторых других компонентов из ТК в различные структуры внутри ядра, в том числе и во вновь образующиеся структуры, вовлеченные в вирусспецифические процессы (Morency *et al.*, 2007; James *et al.*, 2010). При инфекции растений умбравиром происходит реорганизация ТК в содержащие вирусный транспортный белок (ТБ) ТК-подобные структуры, которые сливаются с ядрышком. На следующем этапе вирусный белок в комплексе с белком ядрышка фибрилларин ре-локализуется в цитоплазму, где формирует вирусные РНП-частицы, участвующие в дальнейшем транспорте вирусной инфекции (Kim *et al.*, 2007a; 2007b). Коилин является основным структурным компонентом ТК и также присутствует в нуклеоплазме в диффузном состоянии (Cioce and Lamond, 2005; Collier *et al.*, 2006). Непосредственное физическое взаимодействие коилина с вирусными белками не изучалось.

Для выявления взаимодействия белка ТБГ1 ПЛВМ и его мутантов с рекомбинантным коилином из *Arabidopsis thaliana in vitro* использовали Фар-Вестерн анализ. Рекомбинантные белки разделяли электрофорезом в ДДС-ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану, ренатурировали, инкубировали с рекомбинантным

коином, и белок-белковое взаимодействие выявляли антителами к коину. Как показано на рисунке (Рис. 8) с коином взаимодействует полноразмерный белок ТБГ1, его N-концевая половина, но не С-концевая половина белка ТБГ1. В составе N-концевой половины белка коин связывается с доменом NTD, но не с доменом ID. Замена основных аминокислот на нейтральные в кластере А сопровождается практически полной потерей способности NTD взаимодействовать с коином. Аналогичная замена в кластере В приводит к незначительному снижению связывания. При одновременных заменах в кластерах А и В связывание коина полностью ингибируется. Таким образом, в составе белка ТБГ1 выявляются участок/участки, которые специфически взаимодействуют с коином растений. Главную роль в этом взаимодействии играет положительно заряженный кластер А. Кластер В, возможно, выполняет вспомогательную роль. Интересно, что оба этих кластера отвечают за связывание NTD с РНК *in vitro*, причем кластер А также выполняет основную роль в этих взаимодействиях (Kalinina *et al.*, 2001).

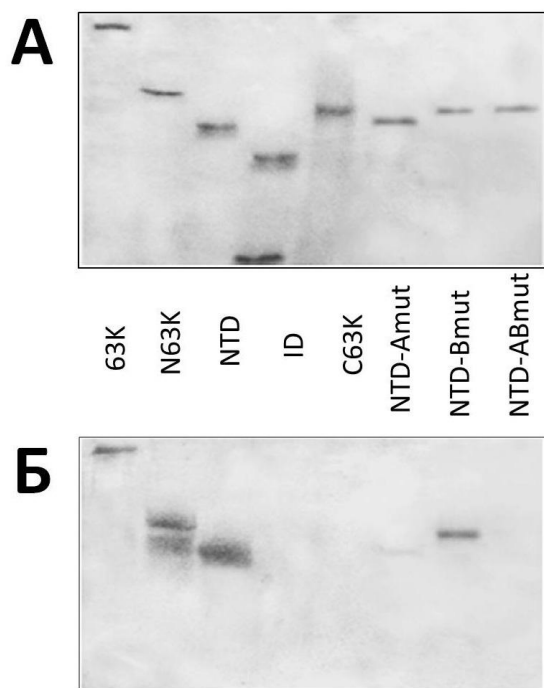


Рис. 8. Взаимодействие белка ТБГ1 ПЛВМ, его делеционных и точечных мутантов с коином *in vitro* (Фар-Вестерн анализ). Реконбинантные вирусные белки, перенесенные на НЦ после ЭФ в ДДС-ПААГ, окрашивали понциановым красным (Ponceau S) (А) или инкубировали с реконбинантным коином из *Arabidopsis thaliana* и выявляли белок-белковое взаимодействие антителами к коину (Б).

Визуализация взаимодействия белка ТБГ1 и коина *in vivo* методом бимолекулярной флуоресцентной комплементации (БиФК).

Временная экспрессия конструкций sYFPN-coilin/sYFPC-coilin при агроинfiltrации листьев *N. benthamiana* сопровождается появлением флуоресценции,

которая локализуется в субъядерных частицах, соответствующих ядрышку и множественным включениям различного размера в нуклеоплазме (Рис. 9). Подобная локализация коилина не является типичной, поскольку в норме белок локализуется в ТК и диффузно в нуклеоплазме. В то же время для клеток *HeLa* показано, что суперэкспрессия экзогенного коилина сопровождается разрушением ТК с одновременным увеличением диффузного нуклеоплазматического компонента и накоплением коилина в ядрышках (Hebert and Matera, 2000). В условиях нашего эксперимента заметное увеличение размеров ядрышка, занимающего значительный объем ядра, и появление в некоторых случаях множественных включений в нуклеоплазме, вероятно, также является следствием суперпродукции экзогенного коилина. Представляется вероятным, что множественные включения коилина в нуклеоплазме не являются ТК, а представляют собой комплексы нуклеоплазматического коилина. В тоже время в некоторых клетках флуоресценция обнаруживается в периферической области ядрышка и единичных структурах, видимо, представляющих собой тельца Кахаля.

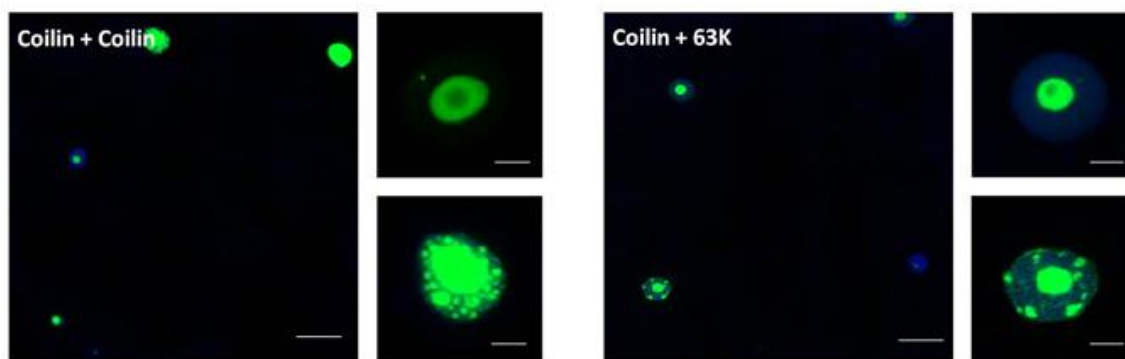


Рис. 9. Визуализация методом бимолекулярной флуоресцентной комплементации взаимодействия между коилином и вирусным белком ТБГ1 в клетках эпителия растений табака *N. benthamiana*. Локализация флуоресценции при взаимодействии между молекулами коилина (sYFPN-coilin + sYFPC-coilin) и молекулами коилина и белка ТБГ1 (sYFPN-coilin + sYFPC-63K), слитыми с половинами YFP, флуоресценция и окраска DAPI. Общий план и изображения отдельных ядер. Масштабная линейка - 5 мкм для ядер и 20 мкм для общего плана.

Полученные результаты по локализации экзогенного коилина требуют дальнейшего детального изучения. Однако появление флуоресценции при использовании метода БиФК согласуется с данными о способности молекул коилина к олигомеризации (Hebert and Matera, 2000).

На рис. 6Б показано, что взаимодействие между молекулами белка ТБГ1, слитого с различными половинами YFP, происходит исключительно в цитоплазме клеток во включениях различного размера. Однако при временной экспрессии в клетках *N.*

benthamiana конструкций sYFPN-coilin и sYFPC-63K или sYFPC-coilin и sYFPN-63K флуоресценция выявляется в тех же структурах ядра, что и при экспрессии соответствующих конструкций, содержащих только коилин, а именно в ядрышке, размер которого увеличен, или в ядрышке и включениях различного размера в нуклеоплазме (рис. 9). Флуоресценция в цитоплазме полностью отсутствует. Полученные методом БиФК результаты свидетельствуют о взаимодействии между коилином и белком ТБГ1 гордеивируса *in vivo* в клетках растения и подтверждают результаты, полученные *in vitro*.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что вирусный транспортный белок способен специфически взаимодействовать с ядерными белками фибрилларином и коилином. В настоящее время неизвестно, как вирусные белки попадают в ядрышко. Предполагается, что первоначально они входят в ядро посредством классического NLS, а затем транспортируются в ядрышко прямо или опосредованно при взаимодействии с компонентами ядрышек (белками ядрышек или РНК) (Hiscox, 2007; Emmott & Hiscox, 2009). Полученные нами данные показали, что кластер В вовлечен в локализацию белка ТБГ1 ПЛВМ, являясь NoLS или частью NoLS. Однако специфическое взаимодействие с фибрилларином и коилином, оба из которых способны локализоваться в ядрышке, не позволяют исключить участие этих белков/белка в транспортировке вирусного белка ТБГ1 в ядрышко. Таким образом, локализация белка ТБГ1 ПЛВМ может зависеть от нескольких факторов, как, например, показано для транспортного белка умбравируса – белка ORF3. Локализация его в ядрышке зависит от NLS и остатка лейцина в составе лейцин-богатого домена белка (NES), вовлеченного в прямое взаимодействие с фибрилларином (Kim et al., 2007b). Мутации в этом домене предотвращают связывание фибрилларина с белком ORF3 и перемещение вирусного белка в ядрышко (Kim et al., 2007a).

Заключение

В настоящей работе в составе N-концевого домена (NTD) гордеивируса ПЛВМ обнаружены последовательности, необходимые для локализации белка ТБГ1 в ядре (предполагаемый NLS), в ядрышке (предполагаемый NoLS) и участки взаимодействия с основным белком ядрышка фибрилларином и основным белком телец Кахаля коилином. NTD вирусов различных таксономических групп с ТБГ гордеивирусного типа не имеют гомологии в аминокислотной последовательности, заметно различаются по длине, но характеризуются наличием кластеров, обогащенных аргинином/лизином, как правило,

обладающих РНК-связывающей активностью (Morozov and Solovyeu, 2003). Эти кластеры (и в целом N-концевые домены белков ТБГ1) выполняют важную роль в дальнем транспорте вирусов по флоэме растений. Мутация одного кластера в случае короткого NTD белка ТБГ1 бенивируса некротического пожелтения жилок свеклы (ВНПЖС) (Erhardt et al., 2000), любого из двух кластеров – в случае длинного NTD гордеивируса ПЛВМ (Kalinina et al., 2001) и делеция части NTD белка ТБГ1 помовируса ВСВК (Wright et al., 2010) не влияют на межклеточный транспорт, но отменяют системный транспорт вирусов. NTD в соответствии с нашими данными (Makarov et al., 2009, 2012) является полностью внутренне неупорядоченным доменом, высокая степень структурной лабильности (подвижности) которого делает его вероятным кандидатом на взаимодействие с различными партнерами - белками и нуклеиновыми кислотами. Поскольку сигналы, отвечающие за ядерную/ядрышковую локализацию и за взаимодействие с коилином, локализируются в составе РНК-связывающих кластеров А и В, возможно, что именно эти активности, а не РНК-связывающие свойства кластеров определяют функциональную роль NTD в вирусной инфекции. Интересно, что распространение инфекции при заражении растений рекомбинантными вирусами ВСВК и ВШМЯ, содержащими в своем геноме ген GFP, слитый с геном белка ТБГ1, ограничено межклеточным транспортом (Lawrence and Jackson, 2001; Wright et al., 2010). Предполагается, что GFP, слитый с N-концом вирусного белка, может нарушать конформацию домена NTD и влиять/отменять на его свойства/активности, необходимые для обеспечения дальнего транспорта вирусного генома.

Обнаружение в составе белка ТБГ1 ПЛВМ специфических участков, отвечающих за локализацию белка в ядрышке и взаимодействие с ядерными белками, свидетельствует в пользу существования специфических функций белка ТБГ1 в ядре клетки и важную роль ядра/ядрышка в инфекционном цикле гордеивирусов. Полученные данные позволяют высказать несколько предположений: 1) локализация в ядре/ядрышке необходима для взаимодействия вирусного транспортного белка с клеточными компонентами, обеспечивающими формирование вирусного РНП-комплекса для выхода в проводящую систему растения (дальний транспорт); 2) ядерные белки удерживают в ядре вирусный белок, необходимый для обеспечения транспорта вирусного генома в растениях, что, может приводить к ингибированию системного распространения вирусной инфекции; 3) учитывая важную роль, которую выполняют фибрилларин/ядрышко и коилин/тельца Кахала в разнообразных процессах в ядре клетки, в частности, в ответе на стресс, можно

предположить, что вирусный белок влияет на функции ядерных белков и опосредованно на развитие вирусной инфекции.

Выводы

1. Показано, что транспортный белок ТБГ1 гордевируса полулентного вируса мятлика, слитый с зеленым флуоресцентным белком, способен локализоваться в ядрышке эпидермальных клеток *N. benthamiana* при индивидуальной экспрессии (в отсутствие других вирусных белков).
2. Показано, что сигналы, необходимые для локализации белка ТБГ1 в ядре и ядрышке, картируются в составе неупорядоченного N-концевого домена (NTD) в пределах кластера А ¹¹⁶KSKRKKKNKK¹²⁵ и кластера В ¹⁷⁵KKATKKESKKQTK¹⁸⁷, соответственно.
3. Выявлено, что рекомбинантный белок ТБГ1 ПЛВМ взаимодействует *in vitro* с белком ядрышка фибриларином (AtFib2 из *Arabidopsis thaliana*) и белком тельца Кахаля коилином (Atcoilin из *Arabidopsis thaliana*). С глицин-аргинин-богатым (GAR) доменом фибрилларина связывается участок домена NTD, включающий первые 82 аминокислотных остатка белка ТБГ1. С молекулой коилина взаимодействует кластер А домена NTD.
4. Взаимодействия между вирусным белком и белками ядрышка (белок ТБГ1 и фибрилларин) и (белок ТБГ1 и коилин) подтверждены опытами *in vivo* при ко-экспрессии в растениях *N. benthamiana* белка ТБГ1 или его делеционных мутантов и каждого из ядерных белков, слитых соответственно с различными половинами желтого флуоресцентного белка. Комплексы фибрилларин-белок ТБГ1 локализуются в ядрышках, тельцах Кахаля и включениях в цитоплазме эпидермальных клеток. Комплексы коилин-белок ТБГ1 локализуются в ядрышках и во включениях в нуклеоплазме.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Semashko M.A., González I., Shaw J., Leonova O.G., Popenko V.I., Taliansky M.E., Canto T., Kalinina N.O. The extreme N-terminal domain of a hordeivirus TGB1 movement protein mediates its localization to the nucleolus and interaction with fibrillarin// *Biochimie*. 2012. V.94. 2012. P. 1180-1188.
2. Семашко М.А., Ракитина Д.В., Гонзалес И., Канто Т., Калинина Н.О., Тальянский М.Э. Транспортный белок гордеивируса взаимодействует *in vitro* и *in vivo* с коилином, основным структурным белком телец Кахаля// Доклады Академии Наук. 2012. Т. 442. № 6. С. 833-836.
3. Kalinina N., Shaw J., Semashko M., Canto T. and Taliansky M. Re-localization of fibrillarin from the nucleolus to cytoplasm in the presence of hordeivirus TGB1 proteins// *International Advances in Plant Virology*. The Netherlands, Arnhem. 2010.
4. Semashko M., Gonzales I., Shaw J., Rakitina D., Canto T., Taliansky M. and Kalinina N. Clusters of Positively Charged Aminoacids of Hordeivirus TGB1 Movement Protein Indispensable for Virus Long-distance Transport Contain Presumable NLS and Interact with Nucleolar Protein Fibrillarin// *International conference on plant vascular biology*. PVB2010. USA. OH.Columbus. 2010. P. 91.
5. Semashko M., Gonzales I., Canto T. and Kalinina N. Hordeivirus movement protein interacts with a nucleolar protein fibrillarin// *35th FEBS Congress. Molecules of Life*. Sweden. Gothenburg. 2010. YSF-104.
6. Kalinina N., Semashko M., Shaw J., Gonzales I., Rakitina D., Canto T., Taliansky M. Hordeivirus TGB1 movement protein is able to interact with fibrillarin both *in vitro* and *in vivo*// *EMBO Workshop. Genomic approaches to interactions between plant viruses, their hosts and their vectors*. Italy. Fenestrelle. 2010. P. 49.
7. Семашко М.А. Транспортный белок ТБГ1 гордеивируса взаимодействует *in vitro* с белком ядрышка фибриларином// Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2008». Секция Биология. Москва. 2008. С. 155.