

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. Ломоносова

*На правах рукописи*

**Панкратенко Анна Владимировна**

**Изучение свойств и функций белка табака,  
эволюционно родственного белку VAR31 человека**

03.01.03 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор  
Морозов Сергей Юрьевич

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель**

Морозов Сергей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты**

Завриев Сергей Кириакович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, заведующий отделом молекулярной биологии и биотехнологии растений ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук

Замятнин Андрей Александрович, доктор биологических наук, доцент, директор Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Бибикова Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры физиологии растений биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 года в \_\_ часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.01 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1.

С диссертацией, а также со сведениями о регистрации участия в удаленном интерактивном режиме в защите можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/266058921/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Среди патогенов, вызывающих болезни растений, одна из самых больших групп представлена вирусами. Для развития инфекции вирус использует и модифицирует хозяйские механизмы внутри- и межклеточного транспорта макромолекул, затрагивая при этом функционирование разнообразных клеточных белков, и глубокий анализ этих процессов невозможен без изучения свойств и функций данных белков в здоровых клетках. Несмотря на многолетние исследования в этой области, многое в ней до сих пор остается неясным.

Одним из малоизученных растительных белков, участвующим в процессах развития вирусной инфекции, является белок 4/1, изначально открытый у *Arabidopsis thaliana* как партнер транспортного белка тосповируса кольцевой гнилости томатов (von Bargon *et al.*, 2001). По-видимому, 4/1 белок вовлечен в ряд клеточных ответов на биотические и абиотические стрессы, либо напрямую в транспорт вирусной инфекции (Solovyev *et al.*, 2013<sup>152</sup>); в растениях *Nicotiana tabacum* наиболее активная экспрессия 4/1 ассоциирована с проводящими тканями гипокотилия и жилок листа на определенных стадиях развития, что подразумевает его роль в регуляции дальнего транспорта (Solovyev *et al.*, 2013<sup>152</sup>). Гены 4/1 белков присутствуют в геномах наземных растений самых разных таксонов и обладают большим структурным сходством (Morozov *et al.*, 2015).

Вероятно, сеть взаимодействий, элементом которой является 4/1, играет важную регуляторную роль в развитии и жизнедеятельности растений. Изучение ее функциональных элементов может иметь большую ценность для развития области фитовирусологии, молекулярной биологии и физиологии растений. Важным этапом в этих исследованиях является идентификация и характеристика белков, с которыми взаимодействует 4/1. Исследованию одного из таких белков и посвящена настоящая работа.

**Степень разработанности темы.** Объектом исследования диссертационной работы является белок табака PBL (plant VAP-like), эволюционно родственную белку VAP31 млекопитающих.

Белок VAP31 был впервые обнаружен в В-лимфоцитах мыши как полипептид, способный образовывать специфичный комплекс с мембранным иммуноглобулином mIgD (Kim *et al.*, 1994). Дальнейшие исследования показали, что VAP31 является мембранным белком, локализованным в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), аппарате Гольджи и (у некоторых клеток) в плазматической мембране (Bell *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2014). VAP31 имеет 3 трансмембранных домена в N-концевой части белка и coiled-coil vDED домен в гидрофильной C-концевой части, обращенной в цитоплазму клетки (Quistgaard *et al.*, 2013).

Протеолиз цитоплазматической части VAR31 приводит к образованию про-апоптического фрагмента p20 (Wang *et al.*, 2003; Iwasawa *et al.*, 2011; Namba *et al.*, 2013). Помимо участия в процессах программируемой клеточной гибели, VAR31 участвует в поддержании митохондриального гомеостаза, являясь одним из связующих элементов в зонах мембранных контактов ЭПР и митохондрии (Iida *et al.*, 2015; Namba, 2019). Белок также участвует в контроле качества и сортировке целого ряда мембранных белков, сопровождая их во время пост-трансляционного созревания в ЭПР, антероградного транспорта или ЭПР-ассоциированной деградации (Stojanovic *et al.*, 2005; Zhang and Williams, 2006; Dejgaard *et al.*, 2010).

Несмотря на большое количество данных, полученных о свойствах и функциях VAR31, а также его голомологов Yet1p и Yet3p у дрожжей (Wilson and Barlowe, 2010), на сегодняшний день в мировой литературе нет никаких публикаций, посвященных характеристике VAR-подобных белков растений.

**Цель работы:** идентифицировать и охарактеризовать свойства белка-партнера 4/1.

**Задачи:**

1. Идентифицировать белок, способный наиболее эффективно взаимодействовать с 4/1 *Nicotiana tabacum* в условиях дрожжевой двугибридной системы.
2. Изучить внутриклеточную локализацию, структуру и способность к ди/олигомеризации идентифицированного белка.
3. Подтвердить способность идентифицированного белка взаимодействовать с Nt-4/1 *in vivo* и *in vitro*.
4. Проанализировать РНК-связывающие способности идентифицированного белка.
5. Изучить влияние вирус-опосредованной экспрессии идентифицированного белка на рост и развитие растений.

**Научная новизна.** В данной работе был впервые идентифицирован белок *Nicotiana tabacum* PBL (Protein Var Like), установлено его структурное сходство с белком VAR31 человека. Впервые показано, что белок NtPBL локализуется в эндомембранной системе клетки, преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме. Впервые показаны РНК-связывающие свойства NtPBL, в частности, высокоафинное связывание предшественников микроРНК, и определены области белка, участвующие в этом связывании. Впервые охарактеризовано взаимодействие NtPBL с Nt-4/1 *in vitro* методом поверхностного плазмонного резонанса и *in vivo* методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Установлено, что транзientная экспрессия NtPBL влияет на фенотип вирусной инфекции в растениях и приводит к патологиям развития, сходным с симптоматикой при нарушениях в регуляции микроРНК.

**Научная и практическая значимость.** Сведения о локализации NtPBL в эндоплазматической системе клетки и его РНК-связывающих свойствах открывают новые направления в исследовании взаимосвязи между функционированием эндоплазматического ретикула и ответом растения на атаку патогена. Полученные данные дополняют представления о молекулярной биологии растений и могут быть использованы в различных областях фундаментальной науки: физиологии растений, фитовирусологии и др. Результаты диссертационной работы также могут иметь большое значение для изучения регуляторных функций микроРНК и механизмов развития вирусной инфекции на уровне растительной клетки.

**Личный вклад автора.** Личный вклад соискателя состоит в анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке полученных экспериментальных данных, анализе результатов и подготовке публикаций. Анализ взаимодействия NtPBL и Nt-4/1 методом поверхностного плазмонного резонанса проводился в сотрудничестве с Е.Ю. Зернием (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского). Исследование РНК-связывающих свойств NtPBL выполнялось совместно с А.К. Атабековой (Биологический факультет Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова). Анализ в дрожжевой двугибридной системе был выполнен компанией «Hybrigenics Services».

**Методология и методы исследования.** Исследования выполнены с использованием современных методов молекулярной биологии, биоинформатики, биохимии и микробиологии. Идентификация белка-партнера Nt-4/1 проводилась методом скрининга в дрожжевой двугибридной системе (компания «Hybrigenics Services»). Анализ аминокислотных последовательностей белков выполнялся с помощью веб-сервисов ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>), Heliquest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) и др. Взаимодействие белков NtPBL и Nt-4/1 было проанализировано *in vitro* методом поверхностного плазмонного резонанса. Внутриклеточная локализация NtPBL и его взаимодействие с Nt-4/1 *in vivo* были исследованы методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Анализ РНК-связывающей способности NtPBL был выполнен с использованием методов сдвига в агарозном геле и сайт-направленного мутагенеза. В работе также использовались такие методы исследования, как вестерн-блот, субклеточное фракционирование, ПЦР, транскрипция *in vitro* и др. Работа выполнена с использованием современного оборудования.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Белок PBL *N. benthamiana* является партнером белка 4/1 *N. tabacum* в условиях дрожжевой двугибридной системы.

2. Белок PBL *N. tabacum*, практически идентичный своему гомологу NbPBL, содержит три трансмембранных домена, а также протяженный гидрофильный участок, способный к ди- и олигомеризации. NtPBL является интегральным белком эндомембранной системы клетки, локализуясь преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме.
3. NtPBL способен взаимодействовать с Nt-4/1 *in vitro*, что подтверждается методом поверхностного плазмонного резонанса.
4. Сверх-экспрессия NtPBL в клетке приводит к изменению внутриклеточной локализации белка Nt-4/1, а также его делеционного мутанта Nt-4/1d90. Взаимодействие происходит с участием гидрофильного конца NtPBL.
5. NtPBL обладает РНК-связывающей активностью. Составной РНК-связывающий сайт располагается в гидрофильной области белка, с наибольшей эффективностью связывает предшественники микроРНК и с меньшей – РНК вириоида PSTVd. В связывании пре-микроРНК задействованы два остатка лизина, располагающиеся в наиболее дистальном С-концевом участке NtPBL.
5. Вирус-опосредованная экспрессия NtPBL-С в растениях приводит к замедлению их роста и деформации листьев.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов подтверждается их воспроизводимостью в нескольких повторных экспериментах, наличием положительных и отрицательных контролей.

По теме диссертационной работы было опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ, и 3 тезиса докладов на российских и международных конференциях.

Результаты работы были представлены на конференциях: 4-м международном симпозиуме «Plant Signaling and Behavior» (Россия, Санкт-Петербург, 2016), IV Российском симпозиуме с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Россия, Казань, 2016), конференции EMBO Workshop "Plasmodesmata, Intercellular communication in development and disease" (Германия, Берлин, 2017), Международной научной конференции "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Россия, Москва, 2017).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 96 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 186 наименований. Работа содержит 1 таблицу и 21 рисунок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

### 1. Идентификация белков, потенциально способных взаимодействовать с Nt-4/1, в дрожжевой двугибридной (ДДГ) системе.

На первом этапе выполнения работы было обнаружено, что генно-инженерная конструкция, кодирующая полноразмерный Nt-4/1, способна автономно активировать экспрессию репортерного гена HIS3. Для преодоления авто-активации, которая препятствует изучению взаимодействий с другими белками, был выполнен делеционный анализ Nt-4/1. Последовательности, кодирующие различные участки Nt-4/1, были клонированы и затем протестированы на способность к авто-активации. Результаты показали, что высокий уровень автономной активации HIS3 вызывают все конструируемые, содержащие N-концевой участок Nt-4/1 (1-226, 1-198 и 1-176); варианты, содержащие делецию в этой области (91-250 и 177-250), такой способностью не обладают (рис. 1). Очевидно, это свидетельствует о наличии в N-концевом участке Nt-4/1 активационного домена.

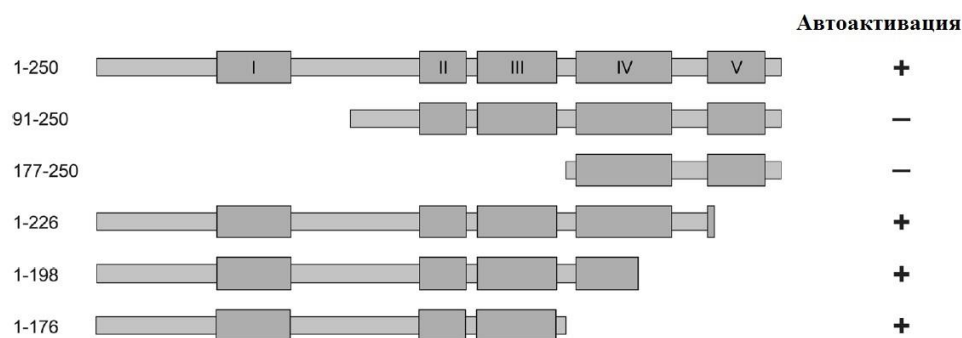


Рис.1. Автономная активация HIS3 полноразмерной формой белка Nt-4/1 и его делеционными мутантами в ДДГ системе. Полная аминокислотная последовательность Nt-4/1 (остатки 1-250) изображена серой линией, coiled-coil домены соответствуют пронумерованным прямоугольникам. Слева перечислены координаты участков Nt-4/1, соответствующие протестированным делеционным вариантам, способность автономно активировать экспрессию HIS3 отмечена справа.

Одним из типов транс-активационных доменов (TAD, transactivation domain), который в случае многих белков вызывает автоактивацию HIS3 в дрожжевых клетках, является так называемый «9aa TAD» паттерн (Piskacek *et al.*, 2007). 4/1 белки, кодируемые различными видами растений, были проанализированы на наличие 9aa TAD доменов с использованием онлайн-сервиса по предсказанию 9aa TAD паттернов (<http://www.med.muni.cz/9aaTAD/>). В качестве исходной последовательности был выбран паттерн 9aa TAD дрожжей (Piskacek *et al.*, 2007). Для N-концевого 90-аминокислотного участка белка Nt-4/1 были предсказаны 3 мотива 9aa TAD, при этом два из них — в позициях 6-14 и 10-18 — были так же обнаружены в ряде других 4/1 белков, включая 4/1 белки *Arabidopsis thaliana* и *Vitis vinifera* (рис. 2).

Вероятно, эти мотивы обуславливают автономную активацию HIS3 в ДДГ системе и имеют функциональное значение в растительной клетке. Важно, что ранее было показано, что Nt-4/1 частично локализуется в ядре (Solovyev *et al.*, 2013<sup>153</sup>).

		1	2		3		
N. tabacum	MAATT	DAAMASLLS	SFAQ	IYAAF	KNGAVEI	QTLOADYIT	GSTKREALEFT..
A. thaliana	MAATS	DEQMNLLS	SFDQ	IYEDFK	IGLNE	INVYRSKSN	VESSRREVLEIS..
V. vinifera	MAATS	DEEMESLLS	TFDQ	IYKDF	QNGVVEV	QLLR	SNCNVEIEKRQALQST..

*Рис.2 Предсказанные 9aa TAD мотивы N-концевого участка 4/1 белков, кодируемых N. tabacum, A. thaliana и V. vinifera. TAD выделены рамками, идентичные аминокислотные остатки выделены серым цветом. Следует обратить внимание, что TAD 1 и 2 перекрываются, а также что TAD3 отсутствует у A. thaliana и не является консервативным для N. tabacum и V. Vinifera*

Для дальнейшего скрининга в ДДГ системе был выбран модифицированный белок Nt-4/1 (91-250), содержащий делецию 90 N-концевых аминокислотных остатков (Nt-4/1d90) и охарактеризованный ранее *in vitro* (Makarova *et al.*, 2011). Для анализа использовалась созданная с набором случайных праймеров кДНК библиотека *N. benthamiana*, содержащая 10 миллионов независимо полученных клонов. При скрининге суммарно были просеквенированы 92 плазмиды кДНК, выделенных из клонов, показавших положительный результат на репортер HIS3. Результаты были проанализированы с использованием BLAST поиска по геному *N. benthamiana* на сайте Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>). Анализ последовательностей показал, что эти клоны содержали 15 уникальных партнеров Nt-4/1d90, которые по основным атрибутированным функциям можно разделить на (1) ядерные белки, часть из которых участвует в регуляции транскрипции и организации хроматина, (2) белки, вовлеченные в организацию цитоскелета, (3) белки, участвующие в биогенезе клеточной стенки и (4) белки с неизвестными функциями.

36 из 92 клонов кодировали фрагменты последовательности белка, являющегося ортологом человеческого белка BAP31 (B-cell receptor-associated protein 31; Kim *et al.*, 1994) и названного NbPBL (*N. benthamiana* plant BAP-like). Анализ BLAST на сайте Sol Genomics Network показал, что NbPBL практически идентичен своему гомологу NtPBL *N. tabacum*; кДНК NtPBL была клонирована и использована в дальнейших *in vivo* и *in vitro* экспериментах.

## 2. Сравнение последовательностей HsBAP31 и NtPBL.

Анализ, выполненный с использованием онлайн-сервиса ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>), показал, что белок содержит три участка, характеризующихся высокой степенью гидрофобности и потенциально соответствующих трансмембранным сегментам (рис.3а), аналогично полученным результатам для HsBAP31, для которого было выявлено три потенциально трансмембранных участка в N-концевой части белка (рис. 3а).



Для NtPBL также предсказано наличие двух coiled-coil мотивов в С-концевой гидрофильной части белка, которые располагаются сходным образом с 2 coiled-coil доменами HsBAP31 (Quistgaard *et al.*, 2013) (рис. 3b). Важно отметить, что несколько клонов, показавших положительные результаты при скрининге в ДДГ системе, кодировали только самый дистальный С-концевой coiled-coil мотив NtPBL.

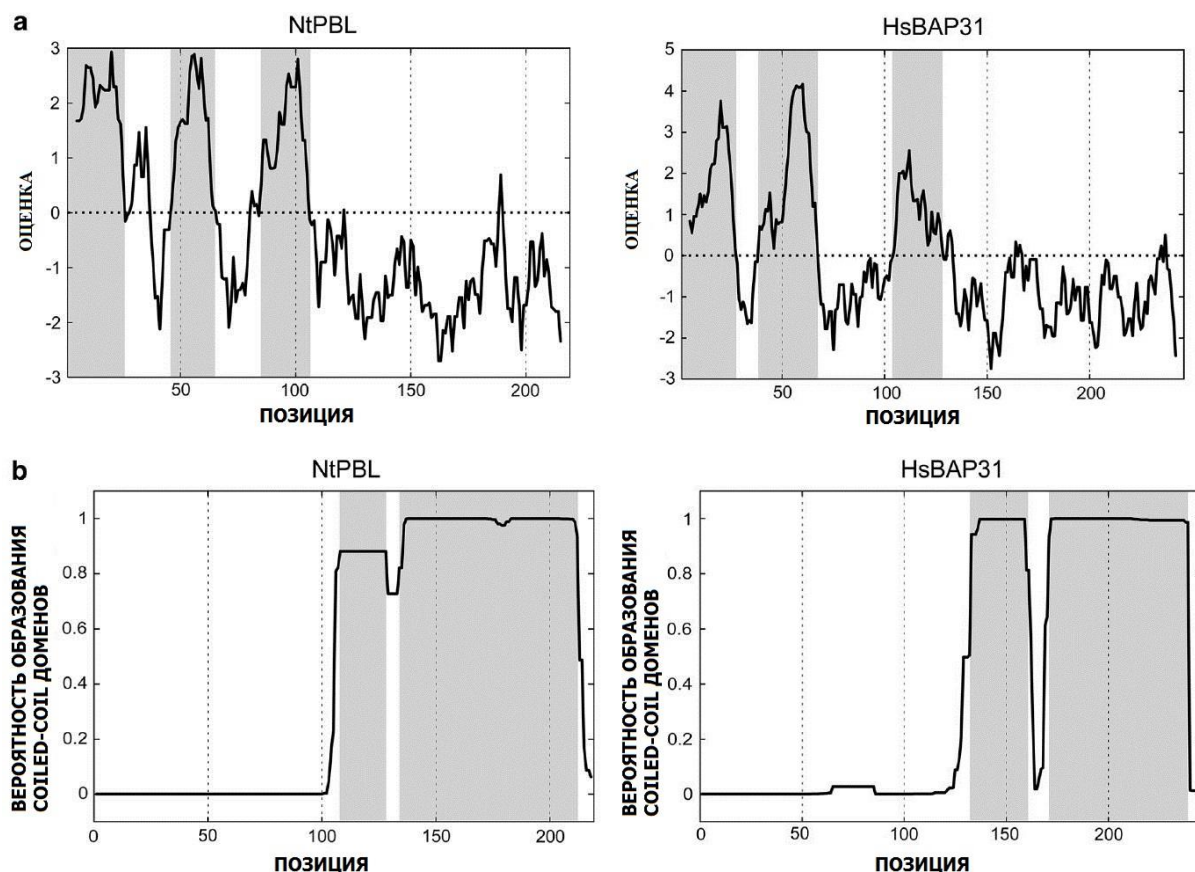


Рис. 3 Сравнение последовательностей NtPBL и HsBAP31. (a) Профили гидрофобности белков, рассчитанные по алгоритму Kyte and Doolittle (1982). Последовательности предсказанных трансмембранных регионов выделены серым цветом. (b) Coiled-coil мотивы, рассчитанные на основе Lupas *et al.* (1991). Серым цветом выделены предсказанные coiled-coil участки.

Выравнивание аминокислотных последовательностей показало, что С-концевые гидрофильные участки NtPBL и HsBAP31 демонстрируют умеренно значимую степень сходства в 24.8% (рис. 4). Таким образом, можно утверждать, что NtPBL и HsBAP31 обладают схожими структурными особенностями и что NtPBL потенциально является интегральным мембранным белком.

NtPBL 106: DRLEHHYIRELRLLRKRKTMEEAAKKQDR-----ALDNCK---NGEASNIKDEISSLRN  
HsBAP31 117: RRLVTLISQQTILLASNEAFKKQAESASEAAKKYMEENDQLKKGAVDGGKLDVGNQAEVKLEENRSLKA

NtPBL 153: KVRQIESSENEAKEKEVKSQKANSDSLKGOSEKILLLEYDRLLLENQNIERSQLQSVDQNVSHSDSKNT  
HsBAP31 187: DLQIKDELASTKQKLEKAENQVLMARKQSEGLTKKEYDRLLLEHAKIQAAVDG-----PMDKKEE

Рис. 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей С-концевых гидрофильных участков NtPBL и HsBAP31. Идентичные остатки выделены черным, сходные — серым цветом.

### 3. Анализ взаимодействия Nt-4/1 и NtPBL *in vitro*.

Для подтверждения взаимодействия между Nt-4/1 и NtPBL был проведен анализ белок-белковых взаимодействий с использованием рекомбинантных белков, экспрессированных в бактериальных клетках и очищенных методом афинной хроматографии. Для проведения эксперимента были выбраны Nt-4/1d90, который использовался в качестве приманки при скрининге в ДДГ, и С-концевой гидрофильный участок NtPBL (далее — NtPBL-С; остатки 106-219), включающий в себя два предсказанных coiled-coil мотива. Параметры взаимодействия NtPBL-С и Nt-4/1d90 определялись *in vitro* с использованием биосенсорного подхода, метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

При равновесном исследовании комплексообразования амплитуды связывания, зафиксированные в стационарном состоянии фазы ассоциации для каждой из инъекций Nt-4/1d90, были соотнесены с концентрациями аналита (рис.5, вставка). Полученный график хорошо описывался моделью «один лиганд — один рецептор» с одним сайтом насыщения (рис.5); образующийся комплекс характеризовался кажущейся равновесной константой диссоциации  $K^{eq}_D = 3.98 \cdot 10^{-6}$  М. В то же самое время данные по кинетике комплексообразования лучше описывались моделью гетерогенности лиганда. Фаза диссоциации на графиках сенсограмм могла быть разделена на этапы быстрой и медленной диссоциации, что гипотетически соответствует связыванию аналита с низко- и высокоафинным лигандом (рис. 6) с соответствующими константами диссоциации в  $3.13 \cdot 10^{-6}$  М и  $2.91 \cdot 10^{-8}$  М.

Наиболее вероятным является объяснение, что на поверхности чипа происходит олигомеризация Nt-4/1d90 и, соответственно, дополнительное накопление вещества, которое детектируется системой как низкоафинное связывание. В пользу этой гипотезы говорят сведения о способности Nt-4/1d90 олигомеризоваться в растворе (Solovyev *et al.*, 2013<sup>153</sup>). По-видимому, высокоафинное взаимодействие между NtPBL-С и Nt-4/1d90 характеризуется меньшей константой  $K_{D2} = 2.91 \cdot 10^{-8}$  М, в то время как константа  $K_{D1} = 3.13 \cdot 10^{-6}$  и близкая к ней кажущаяся равновесная константа диссоциации  $K^{eq}_D = 3.98 \cdot 10^{-6}$  М связаны с димеризацией Nt-4/1d90.

В целом, результаты ППР указывают на то, что NtPBL-С способен взаимодействовать с Nt-4/1d90 с высокой афинностью, и комплексообразование протекает при физиологических концентрациях обоих белков.

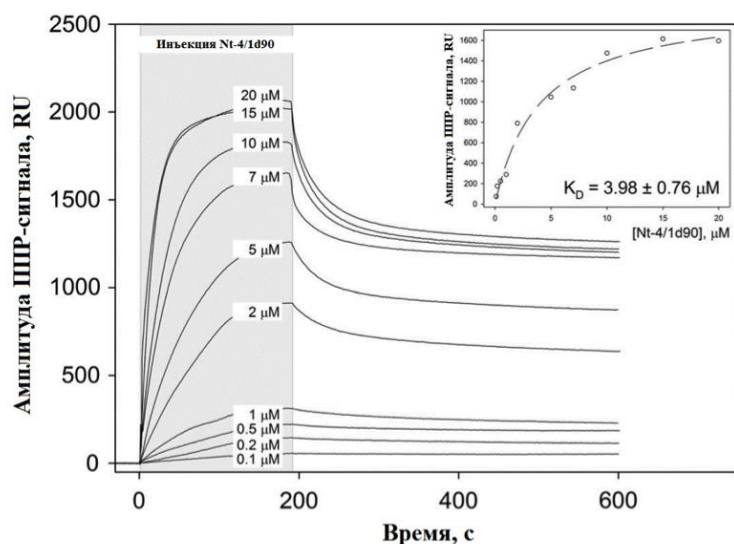


Рис.5 Анализ взаимодействия между NtPBL-C и Nt-4/1d90 методом поверхностного плазмонного резонанса. Сенсограммы ППР, соответствующие кинетике связывания иммобилизованного NtPBL-C с различными концентрациями Nt-4/1d90 (0.1 - 20 μM). На вставке изображена зависимость амплитуды сигнала ППР, зафиксированного в стационарном состоянии фазы ассоциации, от концентрации Nt-4/1d90 в мобильной фазе. Зависимость наиболее хорошо описывается моделью связывания «лиганд-рецептор» с одним сайтом насыщения (пунктирная линия).

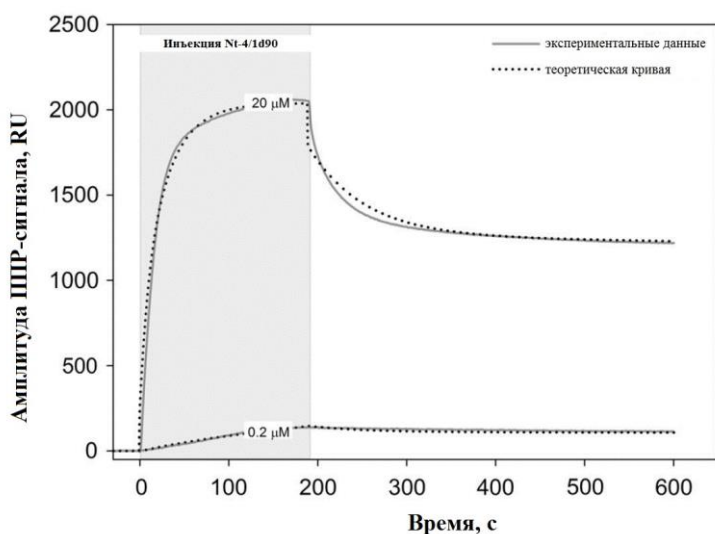


Рис.6 Анализ взаимодействия между NtPBL-C и Nt-4/1d90 методом поверхностного плазмонного резонанса. Сравнение данных ППР-сенсограмм с моделью гетерогенности лиганда (пунктирная линия).

#### 4. Внутриклеточная локализация NtPBL.

Анализ внутриклеточной локализации NtPBL проводился методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием конструкта, в котором кДНК полноразмерного

NtPBL была слита в одной рамке трансляции с последовательностью, расположенной С-терминально и кодирующей мономерный красный флуоресцирующий белок (mRFP).

Результаты показали, что белок NtPBL-mRFP обнаруживается в полигональной сети, по своему виду схожей с ЭПР растительных клеток (рис.7а). Ко-экспрессия белка с GFP, локализующимся в цитоплазме и ядре, показала, что NtPBL также присутствует в ядерной оболочке (рис.7b). Кроме того, NtPBL-mRFP также образовывал крупные, не имеющие определенной формы агрегаты рядом с ядром (рис.7а), что, вероятно, было вызвано сверх-экспрессией белка, а также маленькие тельца, ассоциированные с ЭПР (рис.7с) и напоминающие структуры аппарата Гольджи, однако, в отличие от цистерн АГ, оставшиеся неподвижными.

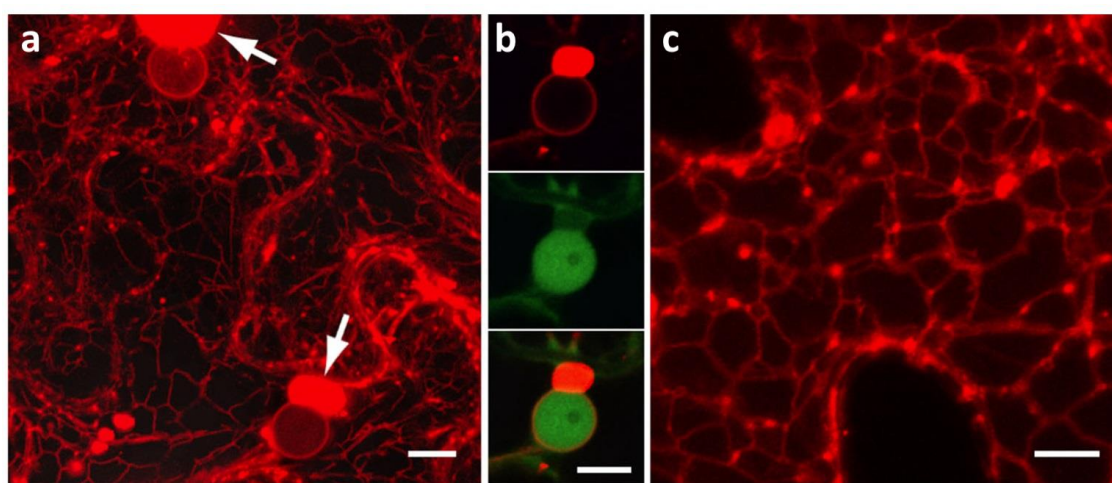


Рис.7 Локализация белка NtPBL-mRFP в эпидермальных клетках листьев *N. benthamiana*. (а) Локализация NtPBL-mRFP в сети ЭПР и ЭПР-ассоциированных тельцах. Стрелки указывают на околядерные включения. (б) Локализация NtPBL-mRFP в ядерной оболочке клеток, транзистентно экспрессирующих NtPBL-mRFP и GFP. Наверху: NtPBL-mRFP. В центре: GFP. Внизу: наложение верхнего и центрального изображений. (с) ЭПР-ассоциированные тельца, содержащие NtPBL, при большем увеличении. Изображения (а) и (с) получены на основе Z-серии оптических срезов; изображение (б) соответствует одиночному оптическому срезу. Шкала соответствует 10  $\mu\text{m}$  (а, б) и 5  $\mu\text{m}$  (с)

Ко-экспрессия NtPBL-mRFP с маркерами клеточных компартментов подтвердила предположение о локализации NtPBL в эндоэпидермальной системе клетки, в частности, в ЭПР. Так, при ко-экспрессии NtPBL-mRFP с m-GFP5-ER, маркером ЭПР, наблюдалась их полная ко-локализация (рис. 8). При этом маленькие ЭПР-ассоциированные тельца, содержащие NtPBL, не ко-локализовались с тельцами аппарата Гольджи, содержащими АГ маркер ST-GFP, но также содержали m-GFP5-ER (рис. 8 с,ф).

Таким образом, эти наблюдения подтверждают наличие предсказанных высокогидрофобных трансмембранных сегментов NtPBL и показывают, что NtPBL в целом



схож по своей внутриклеточной локализации с белком млекопитающих VAP31 (Ng *et al.*, 1997; Breckenridge *et al.*, 2003).

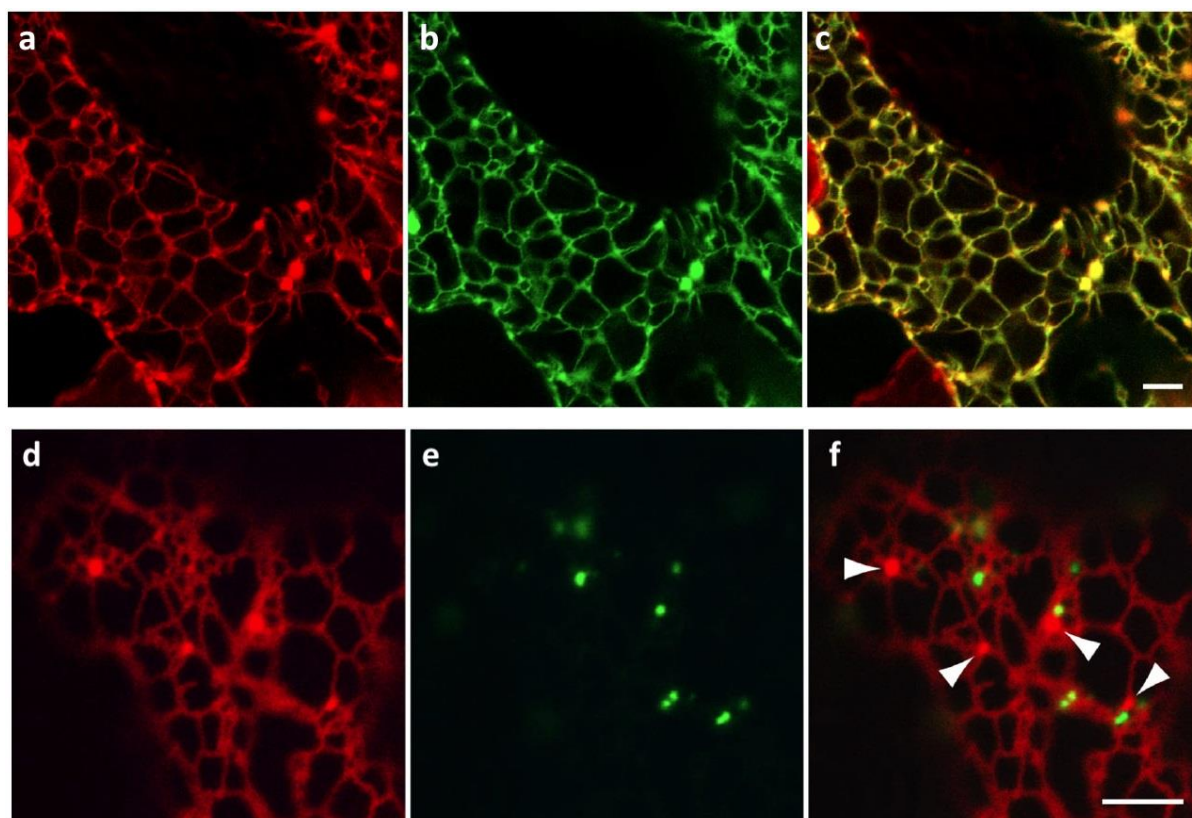


Рис.8 Локализация белка *NtPBL-mRFP* в эпидермальных клетках листьев *N. benthamiana*. (a-c) Ко-экспрессия *NtPBL-mRFP* и маркера ЭПР *m-GFP5-ER*. (a) *NtPBL-mRFP*; (b) *m-GFP5-ER*; (c) наложение изображений (a) и (b). (d-f) Ко-экспрессия *NtPBL-mRFP* и маркера АГ *ST-GFP*. (d) *NtPBL-mRFP*; (e) *ST-GFP*; (f) наложение изображений (d) и (e). Стрелки в (f) указывают на ЭПР-ассоциированные тельца, содержащие *NtPBL-mRFP*. Изображения соответствуют одиночному оптическому срезу. Шкала соответствует 5  $\mu\text{m}$

Возможно, это свидетельствует об эволюционной консервативности функций PBL и VAP31, связанных с регуляцией сортировки белков в ЭПР. Маловероятно, что при этом PBL белки вовлечены в процессы апоптоза, как это показано для белка VAP31, поскольку в клетках млекопитающих образование про-апоптического продукта p20 происходит в результате действия каспазы-8, отсутствующей у растений (Chichkova *et al.*, 2012).

### 5. Влияние сверх-экспрессии *NtPBL* на внутриклеточную локализацию *Nt-4/1d90*

Поскольку взаимодействие с *NtPBL* в ДДГ системе было показано для *Nt-4/1d90*, а не полноразмерной формы белка *Nt-4/1*, возможные взаимодействия *in vivo* были первоначально проанализированы для *NtPBL* и *Nt-4/1d90*.

На третий день после инфильтрации наблюдалось диффузное распределение *Nt-4/1d90-GFP* в цитоплазме и ядре клеток (рис. 9), более сходное с локализацией свободного GFP, чем с локализацией полноразмерного *Nt-4/1*, обычно образующим дискретные цитоплазматические

включения (рис. 11a) (Solovyev *et al.*, 2013<sup>153</sup>). Это наблюдение показывает, что N-концевой участок Nt-4/1 длиной в 90 аминокислот, отсутствующий у Nt-4/1d90, необходим для специфической внутриклеточной локализации данного белка.

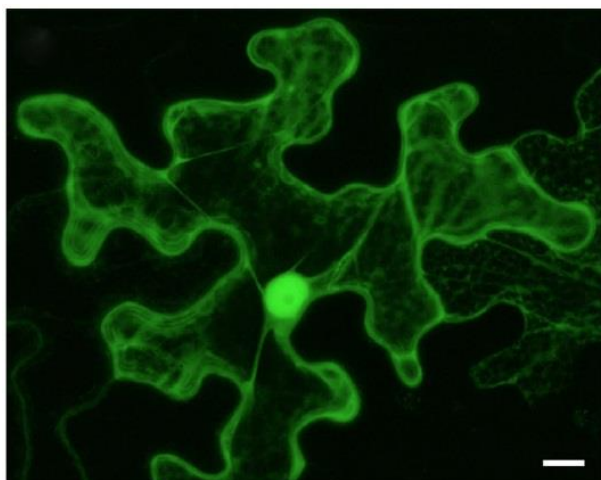
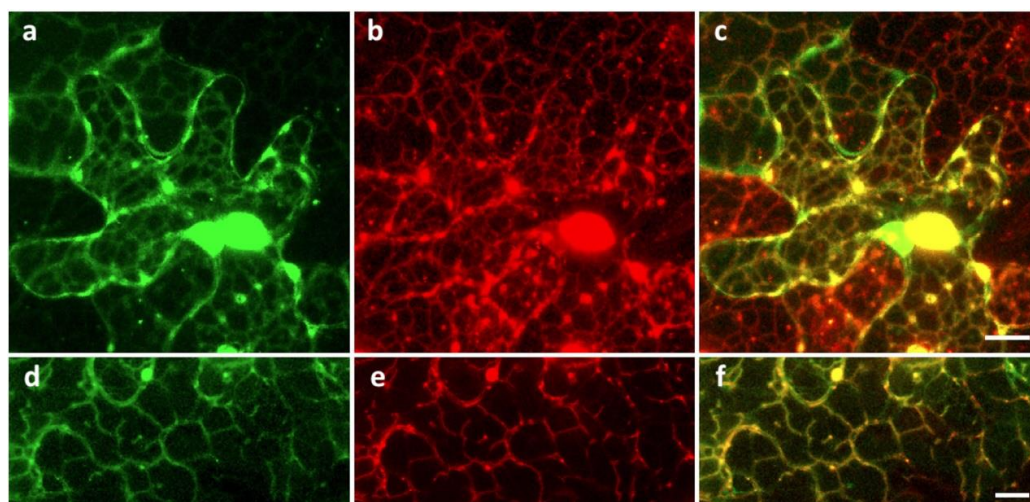


Рис.9. Субклеточная локализация Nt-4/1d90-GFP в эпидермальных клетках листа *N. benthamiana*. Изображение получено на основе Z-серии оптических снимков, мерная шкала соответствует 10  $\mu$ m

Ко-экспрессия NtPBL-mRFP и Nt-4/1d90-GFP не влияла на внутриклеточную локализацию NtPBL-mRFP (рис. 10 с,f). При этом локализация Nt-4/1d90-GFP при ко-экспрессии значительно изменялась: вместо диффузного распределения, наблюдаемого при одиночной экспрессии Nt-4/1d90-GFP, белок обнаруживался в ретикулярной сети, ко-локализованной с ЭПР-структурами, содержащими NtPBL-mRFP, включая как полигональную сеть ЭПР, так и ЭПР-ассоциированные тельца (рис.10). Таким образом, в клетках, сверх-экспрессирующих NtPBL-mRFP, Nt-4/1d90-GFP перенаправлялся к сайтам локализации NtPBL-mRFP.

#### 6. Ко-локализация сверхэкспрессируемого NtPBL с полноразмерным белком Nt-4/1.

Для анализа влияния сверх-экспрессии NtPBL на локализацию полноразмерного белка Nt-4/1, NtPBL-mRFP был ко-экспрессирован методом агроинfiltrации с Nt-4/1-GFP. При этом Nt-4/1-GFP локализовывался во множестве малых флуоресцирующих телец (рис.12 а-f), которые визуально превосходили своим числом аналогичные Nt-4/1 тельца, наблюдаемые при одиночной экспрессии Nt-4/1-GFP (рис. 11).

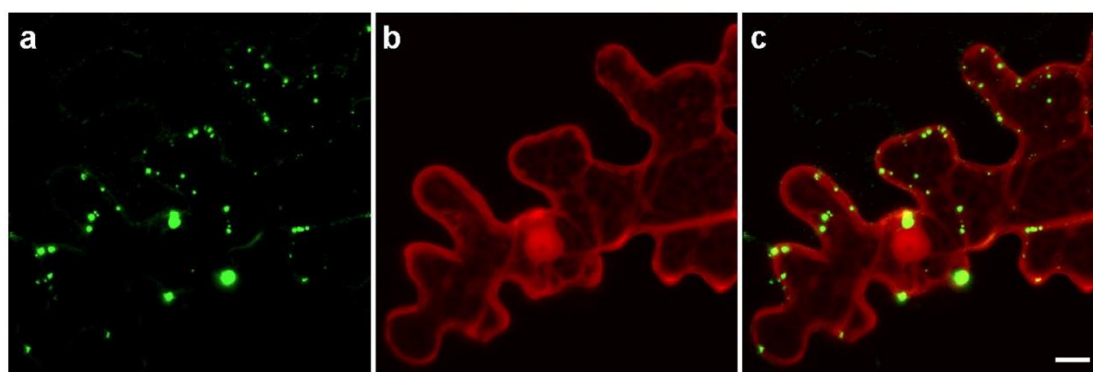


*Рис.10 Транзистентная экспрессия NtPBL-mRFP влияет на субклеточную локализацию Nt-4/1d90. Ко-экспрессия Nt-4/1d90-GFP и NtPBL-mRFP. (a, d) Nt-4/1d90-GFP; (b, e) NtPBL-mRFP; (c) наложение изображений (a) и (b); (f) наложение изображений (d) и (e). Все изображения получены на основе Z-серии оптических снимков. Мерная шкала соответствует 10 мкм*

Важно отметить, что тельца Nt-4/1-GFP располагались вдоль полигональной сети кортикального ЭПР, ко-локализуясь с ЭПР-ассоциированными структурами, содержащими NtPBL-mRFP (рис. 12 с,f). Было обнаружено, что крупные NtPBL-mRFP включения ко-локализуются с агрегатами Nt-4/1-GFP гранулярной структуры (рис.12 i); таким образом, можно заключить, что в клетках, сверх-экспрессирующих NtPBL-mRFP, Nt-4/1-GFP локализуется в NtPBL-содержащих тельцах, ассоциированных с ЭПР, но не с кортикальной сетью ЭПР как таковой.

Данные конфокальной лазерной сканирующей микроскопии указывают на то, что Nt-4/1 и NtPBL действительно взаимодействуют друг с другом в растительных клетках. Можно выдвинуть гипотезу, что это взаимодействие происходит с участием coiled-coil мотивов обоих белков и необходимо для правильной локализации Nt-4/1, хотя различное распределение Nt-4/1 и его мутантной формы Nt-4/1d90 в клетках растений позволяет также предположить, что субклеточная локализация Nt-4/1 определяется его взаимодействием с мембраной.

Взаимодействие NtPBL и Nt-4/1 поднимает вопрос об участии PBL в развитии вирусной инфекции. Поскольку Nt-4/1 способен, в свою очередь, взаимодействовать с рядом вирусных белков, можно предположить, что ассоциация 4/1 и PBL играет роль в механизмах доставки вирусных частиц или транспортной формы вирусного генома к периферии клетки, в частности, к плазмодесмам.



*Рис.11 Субклеточная локализация Nt-4/1-GFP. Ко-экспрессия Nt-4/1-GFP и mRFP. (a) Nt-4/1-GFP; (b) mRFP; (c) наложение изображений (a) и (b). Все изображения получены на основе Z-серии оптических снимков. Мерная шкала соответствует 10 мкм.*



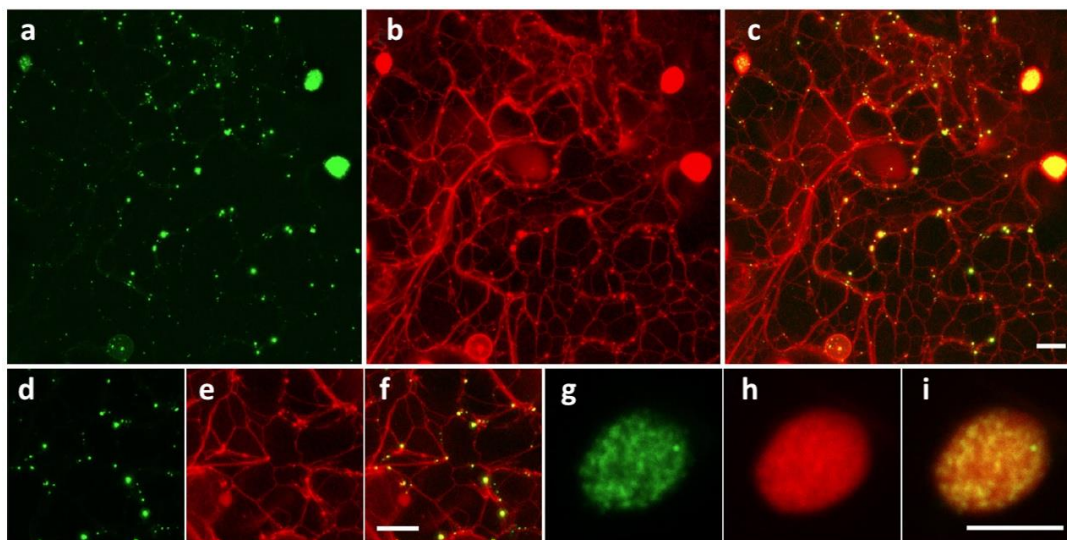


Рис.12 Ко-экспрессия *NtPBL-mRFP* и *Nt-4/1-GFP*. (a-f) Ко-локализация *Nt-4/1-GFP* с ЭПР-ассоциированными тельцами, содержащими *NtPBL-mRFP*. (g-i) Крупные включения *NtPBL-mRFP*, ко-локализирующиеся с агрегатами гранулярных структур, содержащих *Nt-4/1-GFP*. (a, d, g) *Nt-4/1-GFP*; (b, e, h) *NtPBL-mRFP*; (c) наложение снимков (a) и (b); (f) наложение снимков (d) и (e); (i) наложение снимков (g) и (h). Все изображения получены на основе Z-серии оптических снимков. Мерная шкала соответствует 5  $\mu\text{m}$  (i) и 10  $\mu\text{m}$  в остальных изображениях

### 7. Мембранная локализация *Nt-4/1*.

Чтобы биохимически оценить способность *Nt-4/1* взаимодействовать с клеточными мембранами, *Nt-4/1* ген был слит С-терминально с последовательностью, кодирующей метку ЗНА (тройной гемагглютинин), и полученная конструкция была экспрессирована в листьях *N. benthamiana* методом агроинfiltrации, после чего его аккумуляция детектировалась с помощью антител, специфичных к ЗНА. Эксперименты по фракционированию клеток показали, что *Nt-4/1-ЗНА* отсутствовал в S30 фракции растворимых белков, но присутствовал в P30 фракции, содержащей клеточные мембраны (рис. 13), тем самым подтверждая способность *Nt-4/1* взаимодействовать, прямо или опосредованно, с мембранами.

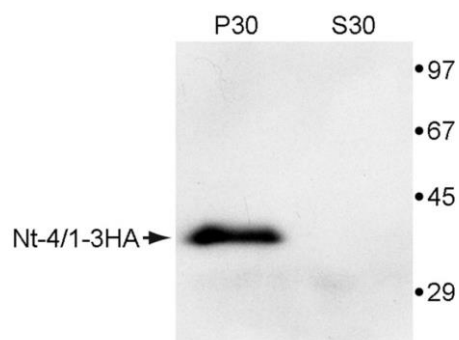


Рис.13 Анализ распределения *Nt-4/1*, слитого с меткой ЗНА (тройной гемагглютинин), методом субклеточного фракционирования. P30 (фракция мембран) и S30 (фракция растворимых белков) были проанализированы методом Вестерн-блота с использованием ЗНА-специфичных антител. Справа отмечено положение маркеров молекулярного веса. Стрелка слева указывает на положение в геле *Nt-4/1-ЗНА*.



Белки, связанные с клеточными мембранами, могут взаимодействовать с ними через гидрофобные, обычно  $\alpha$ -спиральные участки трансмембранных доменов (von Heijne, 2007; Сунгер *et al.*, 2015) или через амфипатические  $\alpha$ -спирали, которые обеспечивают периферическое взаимодействие белка с поверхностью мембраны (Orgel, 2006). Белки также могут быть заякорены в мембранах благодаря посттрансляционным модификациям, таким, как, например, пренилирование, миристиолирование или пальмитоилирование (Hemsley, 2015). Анализ последовательностей 4/1 белков не выявил наличия у них трансмембранных доменов, а также сайтов для вышеуказанных модификаций (поиск проводился с помощью онлайн-сервисов <http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>; <http://mendel.imp.ac.at/PrePS/>; <http://csspalm.biocuckoo.org/online.php>), однако предсказал существование амфипатических  $\alpha$ -спиралей в N-концевом участке 4/1 белков (поиск был проведен с помощью онлайн-сервиса Heliquet <http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>), которые могут быть вовлечены в наблюдаемые взаимодействия с мембранами (рис. 14). Это наблюдение может объяснить резкие отличия во внутриклеточной локализации полноразмерного Nt-4/1 белка и его мутантной формы, не содержащей 90 N-концевых аминокислот.

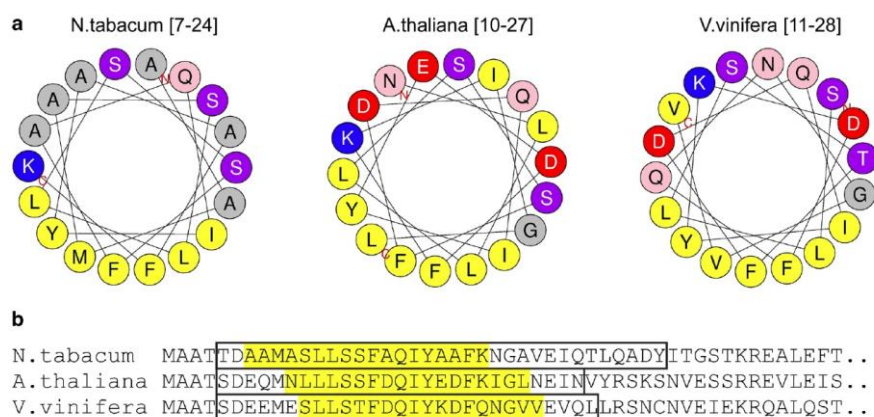


Рис.14 Предсказанные амфипатические  $\alpha$ -спирали 4/1 белков. (а) Круговое изображение спирального участка 4/1 белков, созданное с помощью веб-сервиса Heliquet (Gautier *et al.*, 2008). В каждом варианте предсказано существование гидрофобной структуры из семи последовательно расположенных аминокислотных остатков (выделено желтым цветом). N- и C-терминальные аминокислоты участка отмечены соответственно красными буквами N и C. (б) Выравнивание N-концевых участков трех 4/1 белков. Рамками выделены  $\alpha$ -спирали, предсказанные по алгоритму Chou and Fasman (1974), желтым цветом - спиральные участки, представленные на изображении (а)

## 8. Связывание гидрофильной области NtPBL со структурированной и неструктурированной РНК *in vitro*.

Определенные участки PBL белков высших растений характеризуются высоким содержанием положительно заряженных остатков (рис.15), что позволяет предположить наличие у них РНК-связывающих свойств; анализ последовательностей NtPBL и его растительных гомологов с помощью алгоритмов PPRInt (Kumar *et al.*, 2008), catRAPID (Livi *et al.*, 2015), and RNABindR 2.0 (Walia *et al.*, 2012) также предсказал присутствие РНК-связывающих сайтов в С-концевой гидрофильной части NtPBL (рис. 18) и других PBL белков.

Для экспериментального анализа РНК-связывающих свойств NtPBL был использован его делеционный вариант NtPBL-C, который был экспрессирован в бактериальных клетках, очищен методом афинной хроматографии и ренатурирован путем диализа. Все возрастающие концентрации рекомбинантного белка инкубировали с препаратом определенной РНК, полученной в результате транскрипции *in vitro*, после чего производили анализ образцов методом сдвига в агарозном геле.

В первой серии экспериментов использовались высоко структурированный транскрипт вириона веретеновидности клубней картофеля (PSTVd) (Ding and Itaya, 2007) и неструктурированный транскрипт GFP.

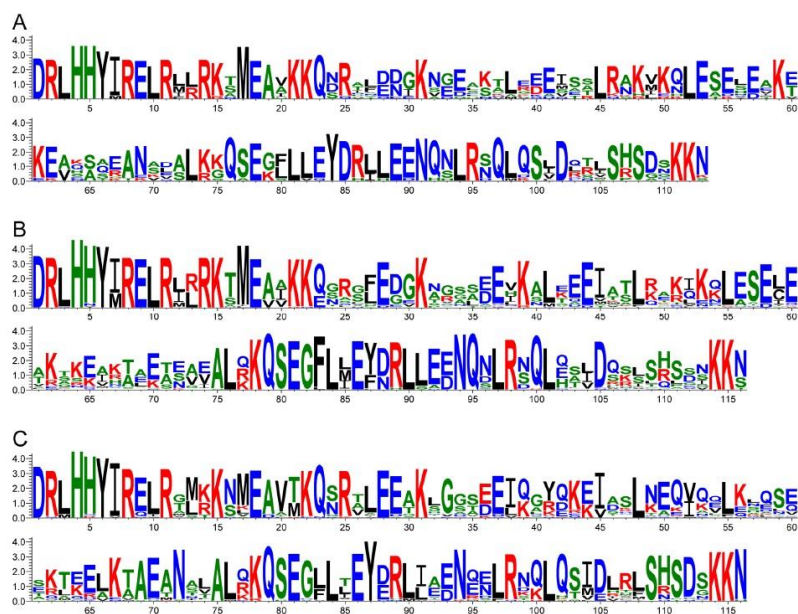


Рис.15 Мотивы С-концевого гидрофильного участка PBL различных видов растений, основанные на выравнивании их аминокислотных последовательностей. Три схемы соответствуют трем основным филогенетическим ветвям цветковых растений, астеридам (A), розидам (B) и однодольным (C). Аминокислотные остатки выделены цветом в соответствии со своими химическими свойствами, положительно заряженные указаны красным.

Увеличение количества белка NtPBL-C приводило к постепенному замедлению движения транскрипта GFP в агарозном геле, и при соотношении белок : РНК = 45:1 вся РНК обнаруживалась в единственной полосе низкой подвижности (рис.16). Инкубация NtPBL-C с РНК-транскриптами PSTVd также приводила к образованию комплексов белок-РНК, причем полное связывание РНК наблюдалось при соотношении белок : РНК = 25:1 (рис. 16). Таким образом, NtPBL-C способен связывать РНК как GFP, так и PSTVd , причем связывание РНК с обширной вторичной структурой проходит с большей эффективностью.

Анализ последовательности VAR31, аналогичный проведенному для PBL, не выявил сайтов, где связывание РНК могло бы происходить с высокой эффективностью. С-концевая гидрофильная область человеческого VAR31 (позиции 124-246), далее обозначаемая HsVAR31-C, была экспрессирована в бактериальных клетках и протестирована в аналогичной серии экспериментов. Результаты показали, что HsVAR31-C не способен взаимодействовать с РНК ни в диапазоне соотношений белок:РНК, аналогичных использованным в работе с NtPBL-C, ни при более высоких отношениях (так, даже при соотношении белок : РНК = 320:1, не наблюдалось комплексообразования) (рис.16). Это подтверждает неспособность HsVAR31-C связывать РНК и показывает, что белки PBL растений могут отличаться по своим свойствам и функциям от VAR31 млекопитающих.

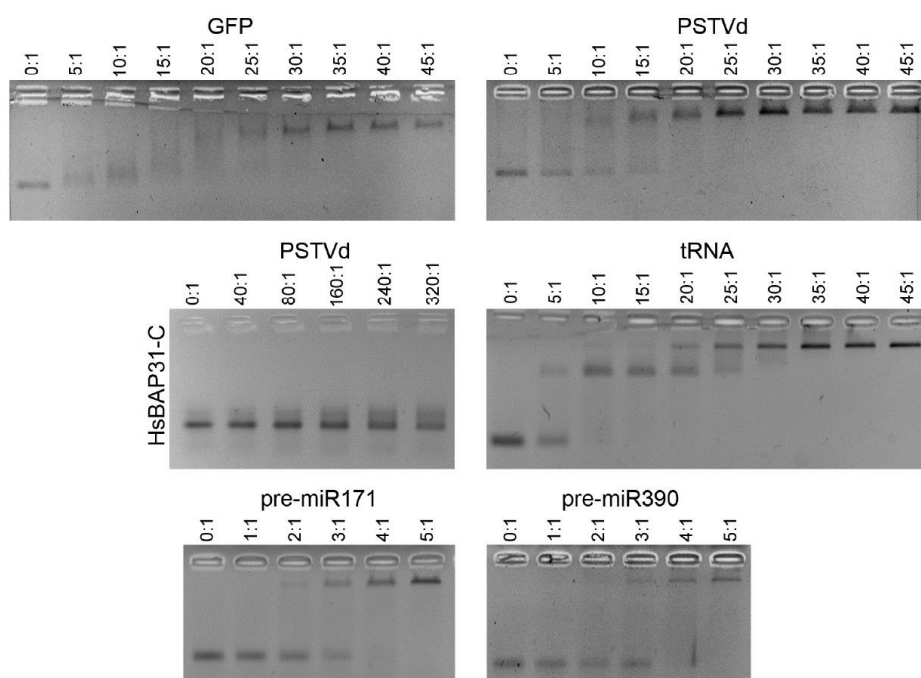


Рис.16 Анализ РНК-связывающих свойств NtPBL-C. Электрофорезу предшествовала инкубация различных вариантов РНК (GFP, PSTVd, tRNA, pre-miR171 или pre-miR390) с различными количествами NtPBL-C в молярных соотношениях, указанных сверху изображения. Соотношение 0:1 соответствует контрольной пробе без добавления белка. Левое изображение в центральном ряду соответствует инкубации PSTVd РНК с HsVAR31-C.

Поскольку NtPBL-C предпочтительно связывался со структурированной РНК, другие субстраты РНК со стабильной вторичной структурой также были протестированы в экспериментах методом сдвига в агарозном геле.

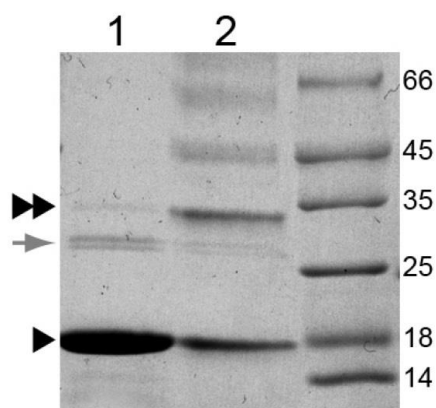
Связывание NtPBL-C с тРНК демонстрировало «двухэтапное» образование комплекса. Уже при соотношении белок : РНК = 10:1 наблюдалось образование дискретной полосы низкой подвижности. Дальнейшее увеличение соотношения белок:РНК приводило к появлению другого дискретного комплекса, обладавшего еще более низкой подвижностью, и при соотношении NtPBL-C : тРНК = 35:1 вся РНК пробы включалась в менее мобильный комплекс (рис. 16).

Результаты демонстрируют, что сродство NtPBL-C к тРНК выше, чем сродство к PSTVd. Наблюдаемое «двухфазное» связывание может указывать на то, что NtPBL-C обладает двойной РНК-связывающей активностью: (1) высоко-афинное связывание, приводящее к образованию комплексов с низкой подвижностью при соотношении белок : РНК = 10:1, и (2) связывание с низкой аффинностью, которое происходит при взаимодействии NtPBL-C с областями РНК, не участвующими в связывании первого типа, и приводит к образованию более крупных комплексов.

На способность взаимодействовать с NtPBL-C были также протестированы предшественники miRNA171 и miRNA390 (pre-miR171 и pre-miR390). Структура несовершенных шпилек этих РНК соответствуют природным субстратам для расщепления DCL1, что приводит к образованию зрелых форм микроРНК (Xie *et al.*, 2014).

Включение исходной РНК в комплексы с низкой подвижностью происходило уже при соотношениях белок : РНК = 5:1 в случаях обоих предшественников, и дальнейшее увеличение количества белка не влияло на подвижность образующихся комплексов (рис. 16); эксперименты по связыванию, проведенные при низких соотношениях концентраций белка и РНК, показали, что вся исходная РНК включалась в комплексы с низкой подвижностью при соотношении количеств белка и РНК в диапазоне от 4:1 до 5:1 (рис. 16). Эти данные демонстрируют, что NtPBL-C способен с высокой степенью аффинности связываться с предшественниками miRNA. Можно предположить, что такие РНК являются естественным субстратом для белков PBL. Принимая во внимание тот факт, что (1) VAP31 млекопитающих обладает способностью перемещаться между околядерным и периферическим компартментами ЭПР, а также плазматической мембраной (Wakana *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2014), и (2) NtPBL является одним из партнеров белка Nt-4/1, который способен влиять на системный транспорт PSTVd у растений (Solovyev *et al.*, 2013<sup>152</sup>), можно предположить, что белки PBL способствуют внутриклеточному и межклеточному транспорту предшественников miRNA и/или структурно сходных молекул РНК.

Перед экспериментами по связыванию РНК препараты NtPBL-C анализировали с помощью электрофореза в ПААГ. Было замечено, что при электрофорезе проб NtPBL-C, буфер которых содержал ДСН, но не меркаптоэтанол или DTT, и которые не были предварительно прогреты до 95°C, в дополнение к основной полосе, соответствующей мономерной форме белка, наблюдалась небольшая полоса, соответствующая его димеру (рис. 17). Это наблюдение может указывать на то, что в своей нативной форме NtPBL-C существует в виде димера.



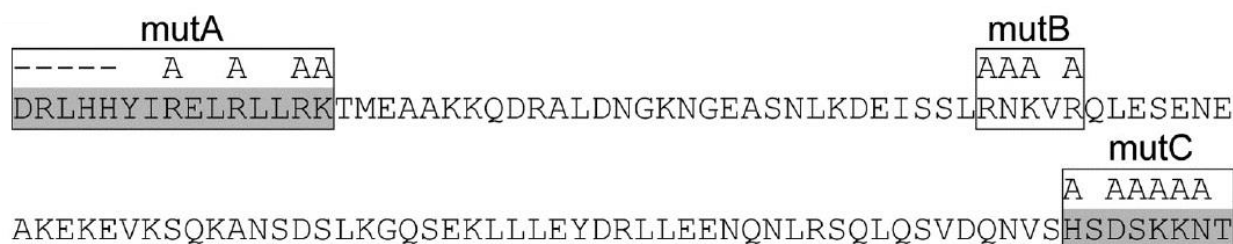
*Рис.17. Анализ NtPBL-C методом ЭФ-ПААГ. (1) препарат NtPBL-C, выделенный из бактериальных клеток и ренатурированный путем диализа, (2) тот же препарат, обработанный формальдегидом. Одиночный и двойной треугольники указывают на мономер и димер NtPBL-C соответственно. Серая стрелка указывает на положение примеси бактериальных белков, выделенной и очищенной совместно с NtPBL-C. Справа расположены белковые маркеры с указанными значениями молекулярной массы.*

Чтобы проанализировать это предположение, препарат NtPBL-C обрабатывали формальдегидом, что приводило к поперечной сшивке ассоциированных молекул белка, а затем анализировали с помощью ЭФ в ПААГ с ДСН, используя в качестве сравнения необработанный белок. В этих условиях яркость полосы, соответствующей димеру белка, значительно возрастала; кроме того, наблюдались дополнительные полосы, предположительно соответствующие олигомерам более высоких порядков (рис. 17). Эти результаты свидетельствуют о том, что NtPBL способен к гомологичному взаимодействию, и согласуются с предсказанным существованием coiled-coil областей, которые обеспечивают димеризацию гомологов NtPBL и образование их комплексов с другими белками. Это также согласуется со стехиометрией образования комплексов NtPBL-C с предшественниками miRNA, поскольку результаты опытов позволяют предположить, что NtPBL-C связывает РНК в форме димера или тетрамера.

## **9. Картирование областей NtPBL, участвующих в связывании РНК**

Для более детального анализа РНК-связывающих свойств NtPBL было проведено картирование областей белка, участвующих в этом процессе. С помощью RNABindR 2.0 были выявлены аминокислотные остатки, предположительно вовлеченные в РНК-связывание; на основе полученных данных для мутагенеза были выбраны N- и C-концевые области NtPBL-C. Кроме того, центральный участок белка, содержащий три положительно заряженных

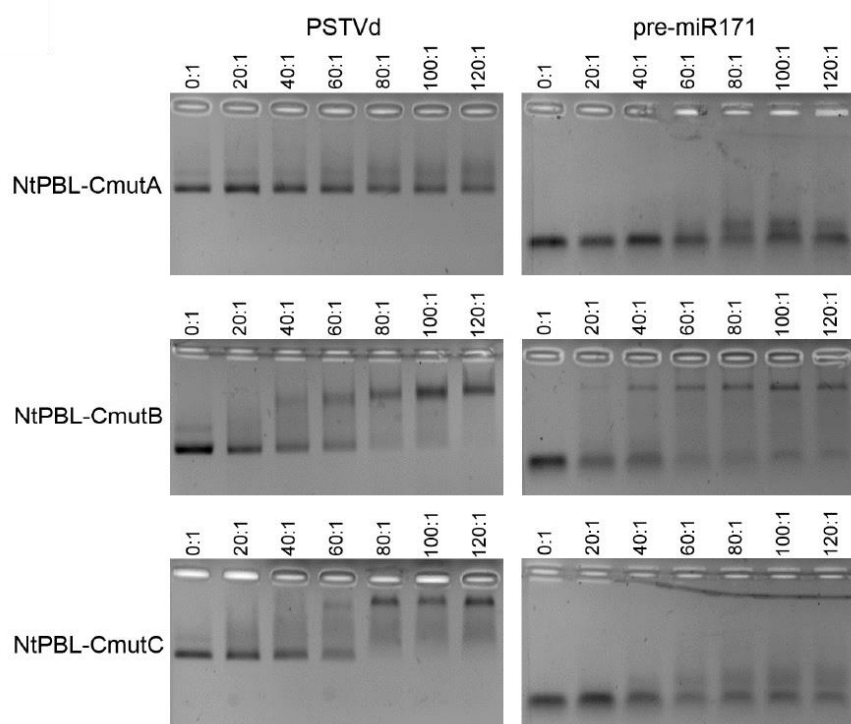
остатка, также был подвергнут сканированию аланином. Суммарно было сконструировано три сайт-специфичных мутантных линии, названных NtPBL-CmutA, NtPBL-CmutB и NtPBL-CmutC (рис. 18). Соответствующие мутантные белки были экспрессированы в бактериальных клетках, очищены методом аффинной хроматографии и использованы в анализах методом сдвига в агарозном геле. В качестве субстратов для связывания были протестированы как PSTVd, так и pre-miR171.



*Рис.18. Мутации, внесенные в С-концевой гидрофильный участок NtPBL. Последовательность соответствует белку дикого типа, участки, измененные в результате мутагенеза, выделены рамками, названия соответствующих мутантов обозначены сверху. Пунктирная линия соответствует делеции аминокислот. РНК-сайты, предсказанные с помощью алгоритма RNABindr 2.0, выделены серым цветом.*

Мутантный белок NtPBL-CmutA в диапазоне соотношений белок:РНК от 5:1 до 45:1 не был способен связываться ни с PSTVd, ни с pre-miR171 (рис. 19). Эксперимент повторяли в диапазоне соотношений белок: РНК от 20:1 до 120:1, однако ни в случае PSTVd, ни в случае pre-miR171 не было обнаружено полос с низкой подвижностью, типичных для нормальной формы белка (рис. 16). Вместо этого наблюдалось постепенное увеличение размывания и образования диффузных полос, по своей подвижности близких к несвязанной РНК; вероятно, это объясняется чрезмерным содержанием белка в инкубационных смесях с высокими значениями соотношения, которое приводило к агрегации NtPBL-CmutA и совместно очищенных бактериальных белков. В любом случае данные анализа показывают, что мутант утратил способность связывать РНК PSTVd или pre-miR171 в концентрациях, типичных для NtPBL-C.

Хотя мутантный белок NtPBL-CmutB сохранил способность образовывать комплексы с низкой подвижностью как с PSTVd, так и с pre-miR171 (рис. 19), эффективность образования комплекса была значительно ниже, чем при взаимодействиях РНК и белка дикого типа. В экспериментах с PSTVd вся исходная РНК была включена в комплексы с низкой подвижностью только при соотношении NtPBL-CmutB : РНК = 120:1 (рис. 19), тогда как сопоставимое соотношение для нормального белка составляло 25:1 (рис. 16).



*Рис.19 Анализ РНК-связывающих свойств NtPBL-С мутантов методом сдвига в агарозном геле. Электрофорезу предшествовала инкубация РНК (PSTVd или pre-miR171) с различными количествами NtPBL-С в молярных соотношениях, указанных сверху изображения*

В случае pre-miR171 даже соотношение белок : РНК = 120:1 не приводило к полному включению исходной РНК в низко-подвижные комплексы (рис. 19). Количественная оценка экспериментов по связыванию NtPBL-CmutB подтвердила, что PSTVd связывался с этим мутантом более эффективно, чем pre-miR171 (табл.). Эти наблюдения показывают, что мутации, введенные в NtPBL-CmutB, не приводят к полной утрате способности белка взаимодействовать с РНК, но делают его менее эффективным, по-видимому, из-за вероятных изменений в третичной структуре или сворачивании NtPBL-С.

*Таблица. Характеристики связывания РНК различными мутантными формами NtPBL*

РНК	белок	Процент исходной РНК, образующий низко-подвижные комплексы при различных соотношениях белок : РНК в пробе					
		20:1	40:1	60:1	80:1	100:1	120:1
pre-miR171	NtPBL-mutB	1.7±0.8	5.9±1.6	8.5±2.1	10.4±2.6	14.5±3.6	14.2±3.2
PSTVd	NtPBLmutB	—	11.2±3.9	17.9±4.4	24.1±5.8	65.4±8.3	64.9±7.1
PSTVd	NtPBLmutC	—	—	10.4±4.8	36.8±9.1	45.6±10.2	56.8±12.4

Паттерны связывания pre-miR171 и PSTVd с мутантной формой NtPBL-CmutC различались между собой. Данный мутантный вариант образовывал комплексы с низкой подвижностью с PSTVd, причем большая часть исходной РНК включалась в комплексы при соотношении белок:РНК=80:1 (рис. 19), и дальнейшее увеличение соотношения не усиливало включение

РНК в комплексы (что могло быть связано с частично неправильным сворачиванием мутантного белка) (рис. 19); в то же время NtPBL-CmutC был неспособен связывать pre-miR171 в комплексы с низкой подвижностью (рис. 19). Как и в случае NtPBL-CmutA, при высоких соотношениях наблюдалось размывание, а не образование дискретных полос, что, вероятно, объясняется чрезмерным содержанием белка в пробах (рис. 19).

Поскольку мутации, введенные в NtPBL-CmutC, блокировали связывание предшественника miRNA, но не лишали белок способности образовывать комплексы с низкой подвижностью с PSTVd, можно сделать вывод, что в аффинном связывании предшественников miRNA участвует С-концевая область белка, содержащая эти мутации. Напротив, N-концевая область NtPBL-C, модифицированная в NtPBL-CmutA, является необходимой для связывания обоих анализируемых РНК-субстратов. Возможно, N- и С-концевые части гидрофильной области NtPBL образуют единый составной РНК-связывающий сайт, который может взаимодействовать с высокой аффинностью с предшественниками miRNA и меньшей аффинностью — с другими субстратами РНК; мутации, затрагивающие его N-концевую часть (например, мутации в NtPBL-CmutA), могут полностью блокировать способность NtPBL взаимодействовать с РНК; мутации, лишаящие функциональности его С-концевую часть (например, в NtPBL-CmutC), блокируют только взаимодействие с предшественниками miRNA, тогда как связывание с другими субстратами уменьшается, но не исчезает. В любом случае данные, полученные в ходе экспериментов по мутагенезу NtPBL-C, позволяют предположить, что взаимодействие NtPBL с предшественниками miRNA определяется РНК-связывающим сайтом, включающим два остатка Lys, расположенных на С-конце белка, и являющимися консервативными для многих PBL белков.

## **10. Экспрессия гидрофильной области NtPBL в растениях влияет на развитие вирусной инфекции.**

Для анализа возможных эффектов временной экспрессии в растениях гидрофильной области NtPBL был использован вектор pYL156 на основе РНК2 вируса погрешности табака (TRV) (Liu *et al.*, 2002), который является одним из наиболее часто используемых для вирус-индуцированного сайленсинга генов и позволяет экспрессировать чужеродные полипептиды, слитые с N-концевой областью белка 2b TRV (длиной 100 аминокислотных остатков) (рис. 20). Фрагмент гена NtPBL, кодирующий аминокислотные остатки 109-219 С-концевой гидрофильной области, был клонирован в pYL156 в одной рамке с последовательностью гена 2b; полученная конструкция TRV2-NtPBL-C была агроинфильтрирована совместно с конструкцией TRV RNA1 (TRV1) в растения *N. benthamiana*, чтобы инициировать вирусную инфекцию. В качестве контрольной группы использовались растения *N. benthamiana*, инфицированные смесью TRV1 и немодифицированного вектора pYL156 (TRV2).



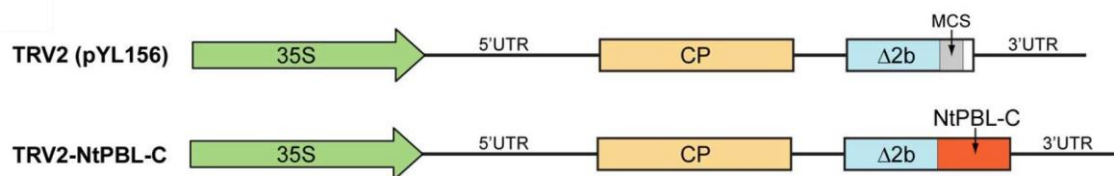


Рис.20 Схематичное изображение векторного конструктора *pYL156* на основе *RNA2 TRV*, а также его производного *TRV2-NtPBL-C*. Кодированные белки обозначены прямоугольниками, зеленая стрелка соответствует положению *35S*-промотора *CaMV*, указаны нетранслируемые участки *RNA2 5'UTR* и *3'UTR*. *CP* - капсидный белок вируса; *Δ2b* — фрагмент *2b* белка, слитый с пептидом, клонированным в область *MCS* (*multiple cloning site*). На схеме *TRV2-NtPBL-C* красным выделена последовательность *NtPBL-C*, трансляционно слитая с *Δ2b*

Через 15 дней после инфильтрации верхние листья системно инфицированных растений (*TRV1 + TRV2*) демонстрировали умеренную мозаику и умеренную задержку роста по сравнению со контрольными растениями (рис. 21). При этом верхние листья растений, инфицированных *TRV1* и *TRV2-NtPBL-C*, демонстрировали сильную задержку роста и нарушения в развитии листьев (рис. 21). Кроме того, на некоторых системно инфицированных листьях растений, инокулированных *TRV1* и *TRV2-NtPBL* (рис. 21), наблюдались рассеянные участки некрозов. Следовательно, экспрессия *NtPBL-C* в контексте генома *TRV* значительно изменила фенотип инфекции *TRV* у *N. benthamiana*.

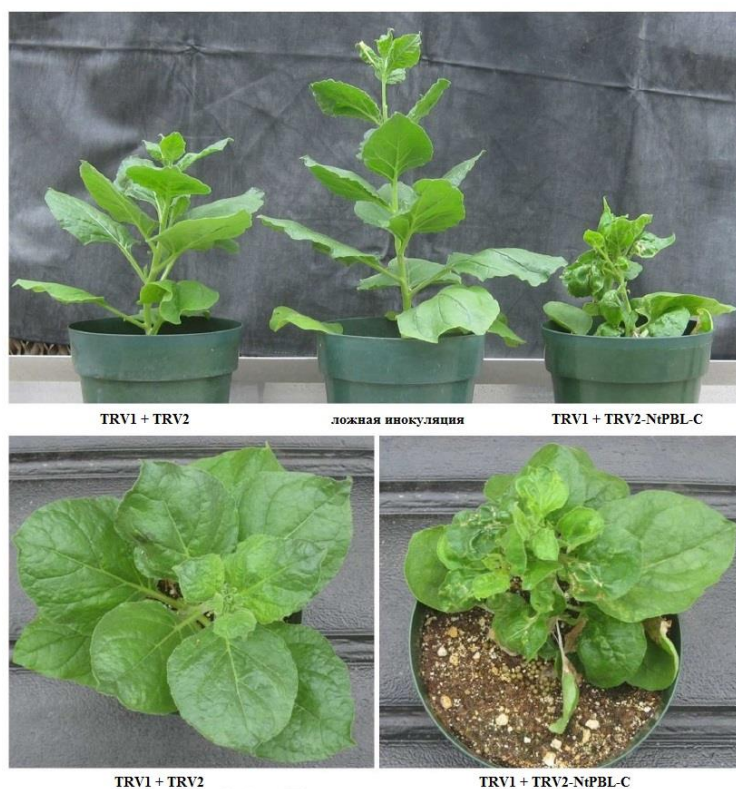


Рис.21 Фенотипы растений *N. benthamiana*, инфицированных *TRV1 + TRV2* или *TRV1 + TRV2-NtPBL-C*. Показан вид сверху и сбоку; ложная инокуляция соответствует контрольному растению, инокулированному буфером.

Наблюдаемые фенотипические эффекты (задержка роста и нарушение развития листьев) при *TRV*-опосредованной экспрессии *NtPBL-C* сходны с аномалиями, возникающими при экспрессии вирусных супрессоров

*РНК-сайленсинга*, нарушающих сигнальные пути микроРНК (*Kasschau et al.*, 2003; *Chellappan*

*et al.*, 2005; Soitamo *et al.*, 2011), которые играют огромную роль в регуляции развития растений (Chen, 2012). Например, было показано, что супрессор *p19*, кодируемый вирусом кустистой карликовости томата, связывает продукты расщепления *pre-miR171*, представляющие собой дуплекс *miR171* и комплементарного фрагмента предшественника данной *miRNA*, и ингибирует *miR171*-направленное расщепление мРНК *SCL6-IV* (Chapman *et al.*, 2004). Принимая во внимание наблюдаемое высокоаффинное связывание предшественников *miRNA* с *NtPBL-C*, можно предположить, что морфологические изменения в листьях растений, системно инфицированных *TRV2-NtPBL-C*, вызваны нарушением функционирования микроРНК в результате действия *NtPBL-C*. Эта гипотеза согласуется с наблюдаемым связыванием между *NtPBL-C* и предшественниками двух микроРНК, непосредственно участвующих в развитии растений. В самом деле, мишенями *miR171* являются транскрипционные факторы *SCL* (*scarecrow-like*), необходимые для пролиферации клеток меристемы и полярной организации (Wang *et al.*, 2010), в то время как *miR390* необходима для биогенеза *tasiRNAs*, образующихся в локусе *TAS3*, которые участвуют в регулировании времени вегетативного развития и полярности органов (Axtell *et al.*, 2006).

## ВЫВОДЫ

1. Основным партнером белка *Nt-4/1* в условиях дрожжевой двугибридной системы является белок *N. benthamiana PBL*.
2. Белок *NtPBL*, близкий гомолог *NbPBL*, структурно сходен с белком *BAR31* млекопитающих и содержит три трансмембранных домена, а также протяженный С-концевой гидрофильный участок, способный к ди- и олигомеризации. *NtPBL* локализуется в эндомембранной системе клетки, преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме.
3. Гидрофильный участок *NtPBL* способен взаимодействовать с *Nt-4/1 in vitro*, что подтверждается методом поверхностного плазмонного резонанса. Сверх-экспрессия полноразмерного *NtPBL* в растительной клетке приводит к изменению внутриклеточной локализации белка *Nt-4/1*, а также его делеционного мутанта *Nt-4/1d90*.
4. Гидрофильный участок *NtPBL* обладает РНК-связывающей активностью, с наибольшей эффективностью взаимодействуя с предшественниками микроРНК (пре-микроРНК), и с меньшей – с РНК вириоида *PSTVd*. РНК-связывающий сайт *NtPBL* является составным, причем в высокоспецифичном связывании пре-микроРНК задействованы два остатка лизина, располагающиеся в наиболее дистальной С-концевой области белка.
5. Вирус-опосредованная транзientная экспрессия *NtPBL-C* в растениях *N. benthamiana* приводит к нарушениям в развитии, выражающимся как замедление роста и деформация листьев.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Соискатель имеет 3 статьи по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных системах цитирования и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

### Список статей, опубликованных по теме диссертации

1. **Pankratenko, A.V.**, Atabekova, A.K., Lazareva, E.A., Baksheeva, V.E., Zhironkina, O.A., Zernii, E.Y., Owens, R.A., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y. (2017) Plant-specific 4/1 polypeptide interacts with an endoplasmic reticulum protein related to human BAP31. *Planta*, 245:193-205 (импакт-фактор 3.06)
2. Atabekova, A.K., **Pankratenko, A.V.**, Makarova, S.S., Lazareva, E.A., Owens, R.A., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y. (2017) Phylogenetic and functional analyses of a plant protein related to human B-cell receptor-associated proteins. *Biochimie*, 132:28-37 (импакт-фактор 3.36)
3. Morozov, S.Y., **Pankratenko, A.V.**, Atabekova, A.K., Solovyev, A.G. (2017) Data on the exon-intron organization of genes coding for B-cell receptor-like proteins. *Data in Brief*, 12:616-623 (CiteScore: 0.93)