

УДК 577.212.3

НЕСТРУКТУРНЫЕ ФУНКЦИИ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ГОРДЕИВИРУСА, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ ПРИ ИНФЕКЦИИ РАСТЕНИЙ ХИМЕРНЫМ ТОБАМОВИРУСОМ^{*,**}

© 2019 С.С. Макарова¹, А.В. Махотенко², А.В. Хромов^{1,2},
Е.В. Скурат¹, А.Г. Соловьев^{2,3}, В.В. Макаров²,
Н.О. Калинина^{2***}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: stmakarova@gmail.com

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: kalinina@genebee.msu.ru

³ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии, 127550 Москва, Россия;
электронная почта: solovyev@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 01.08.18

После доработки 12.09.18

Принята к публикации 12.09.18

Белки оболочки (+)РНК-содержащих вирусов растений являются многофункциональными белками, которые в дополнение к основной функции формирования капсида, участвуют в различных этапах вирусной инфекции. Например, белок оболочки (БО) тобамовирусов необходим для системного транспорта вируса в растении и определяет взаимодействия между вирусом и растением, влияя на спектр хозяев, инфекционность, патогенность и выраженность симптомов. Гордеивirusы, как и тобамовирусы, принадлежат к семейству *Virgaviridae*, имеют спиральные палочковидные вирионы, а их белки оболочки обладают сходной структурой. Однако для БО гордеивирусов «неструктурных» функций выявлено не было. В настоящей статье изучены возможные неструктурные функции БО гордеивируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ). С этой целью в геноме тобамовируса просветления жилок турнепса (ВПЖТ) ген собственного БО был заменен на ген БО ВШМЯ дикого типа или его мутантные варианты. Показано, что БО ВШМЯ может эффективно замещать БО ВПЖТ на всех этапах инфекционного цикла. Он способен комплементировать функцию БО тобамовируса в процессе дальнего транспорта химерного тобамовируса по растению, выполнять роль элиситора гиперчувствительного ответа и являться детерминантой патогенности, влияющей на симптомы вирусной инфекции. Химерный тобамовирус, кодирующий БО ВШМЯ с делецией С-концевого участка характеризовался повышенной инфекционностью и был способен распространяться по растению в форме атипичных вирионов (рибонуклеопротеидных комплексов).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус растений, тобамовирус, гордеивирус, химерный вирус, белок оболочки, транспорт, симптомы инфекции.

DOI: 10.1134/S0320972519010093

Белки оболочки вирусов растений инкапсидируют геном вируса, защищая его от деградации. Несмотря на то, что сборка и разборка вирусных частиц являются каноническими функциями белков оболочки, в последние десятиле-

тия стало очевидным, что эти белки многофункциональны и вовлечены во многие стадии вирусной инфекции. Действительно, белки оболочки выполняют различные неструктурные (не связанные с инкапсидацией) функции, такие

Принятые сокращения: БО – белок оболочки вируса (капсидный белок); ВПЖТ – вирус просветления жилок турнепса; ВТМ – вирус табачной мозаики; ВШМЯ – вирус штриховатой мозаики ячменя; ГО – гиперчувствительный ответ; ДАБ – диаминобензидин; ДЛС – динамическое лазерное светорассеяние; дни – день после инфильтрации; дтВПЖТ – вирус просветления жилок турнепса дикого типа; ТБ – транспортный белок; ТБГ-белки – транспортные белки, кодируемые тройным блоком транспортных генов; (+)РНК – однонитчатая РНК положительной полярности; РНП-комплекс – рибонуклеопротеидный комплекс; КД – круговой дихроизм.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ18-223, 29.10.2018.

** Статья на английском языке опубликована в томе 83, вып. 12, 2018.

*** Адресат для корреспонденции.

как регуляция репликации, транскрипции и трансляции [1–4].

Среди белков оболочки спиральных вирусов растений с позитивным РНК-геномом ((+) РНК) БО вируса табачной мозаики (ВТМ) является наиболее изученным как структурно, так и функционально. Показано, что удаление гена *BO* тобамовируса влияет на межклеточный транспорт рибонуклеопротеидных комплексов (РНП-комплексов), состоящих из транспортного белка (ТБ) и вирусной РНК [5], а репликация мутантного вируса проходит менее эффективно, чем репликация ВТМ дикого типа [6, 7]. Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют о том, что БО ВТМ может прямо или опосредованно регулировать образование вирусных репликативных комплексов, синтез субгеномных РНК и трансляцию этих РНК, что, в свою очередь, может влиять на формирование комплексов ТБ–РНК и транспорт вирусного генома [7–10].

Другие известные функции БО ВТМ, не связанные с инкапсидацией, относятся к взаимодействию вируса с растением-хозяином, в частности, с защитным ответом растения. Недавно было продемонстрировано, что БО ВТМ, совместно с ТБ, активирует пути распада РНК на поздних стадиях вирусной инфекции, что приводит к ингибированию противовирусного системного сайленсинга [11]. В дополнение, БО ВТМ является элиситором гиперчувствительного ответа (ГО), опосредованного геном устойчивости *N'* в растениях *Nicotiana sylvestris* [12, 13]. Было обнаружено, что белки оболочки других тобамовирусов также являются элиситорами ГО, опосредованного различными генами устойчивости в растениях рода *Capsicum* [14–16]. БО ВТМ может также выступать в качестве фактора негативной регуляции защитного ответа растений, вызывая супрессию защитных сигнальных путей растения [17, 18]. Показано, что замены различных аминокислотных остатков, делеции и вставки пептидов в БО ВТМ значительно влияют на симптомы и характер системной инфекции при заражении растений химерными и мутантными вирусами [12].

Гордеивирусы, также, как и тобамовирусы, относятся к семейству *Virgaviridae* и представляют собой (+)РНК-содержащие вирусы растений со спиральными палочковидными вирионами [19]. Интересно, что тобамовирусы и гордеивирусы, будучи сходными по структуре вириона, реализуют разные стратегии транспорта вирусного генома по флоэме растения при развитии системной вирусной инфекции. В отличие от БО тобамовирусов БО ВШМЯ не участвует в межклеточном и дальнем транспорте вируса по проводящей системе растения: на всех этапах

транспорт генома гордеивирусов в форме РНП-комплекса обеспечивают три ТБ, кодируемые тройным блоком транспортных генов (ТБГ) [20]. Роль детерминанты патогенности у гордеивирусов, отвечающей за вирулентность и симптомы, выполняет супрессор сайленсинга – короткий цистеин-богатый белок, также необходимый для дальнего транспорта [21], и гамма а субъединица вирусной репликазы. Также показано, что элиситором ГО в ячмене является транспортный белок ТБГ1 [22]. Данные о неструктурных функциях БО гордеивируса отсутствуют. Возможно, что подобные функции БО дублируются и/или перекрываются с функциями других вирусных белков. Таким образом, весьма вероятно, что гордеивирусный БО может обладать дополнительными функциями, которые до настоящего времени не были выявлены.

Основываясь на структурном сходстве БО ВШМЯ и БО тобамовируса [4] и ранее полученных данных об инфекционности химеры ВТМ–ВШМЯ, представляющей собой геном ВТМ штамма U1, в котором ген *BO* заменен на ген *BO* ВШМЯ [23], в настоящей работе мы создали химерный тобамовирус – вирус просветления жилок турнепса (ВПЖТ), кодирующий вместо собственного белка оболочки БО ВШМЯ или его мутантные варианты. Используя эту экспериментальную систему, мы изучили основные характеристики инфекции растений *N. benthamiana*, зараженных полученными химерами, с целью выявления возможных неканонических функций БО ВШМЯ. Показано, что БО ВШМЯ может заменить собственный БО тобамовируса без значительных потерь в инфекционности химерного вируса, и в частности, его способности к дальнему транспорту. Он также может выполнять функцию элиситора ГО и детерминанты патогенности, влияя на симптомы вирусной инфекции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение генно-инженерных конструкций. На основе конструкции рQE30 БО ВШМЯ (полученной ранее в нашей лаборатории) с помощью специфических праймеров BSMV-CP-VamHI-P/BSMV-CP-M-SalI (таблица), был получен ПЦР-продукт, который обрабатывали эндонуклеазами рестрикции VamHI/SalI и лигировали в конструкцию, представляющую собой геном ВПЖТ, клонированный в составе вектора pCambia1300 (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585>), вместо собственного гена *BO*. Кодирующие последовательности делеционных мутантов ΔN -БО^{ВШМЯ}, ΔC -БО^{ВШМЯ}, были амплифицированы на матрице полноразмерного белка рQE30

Праймеры, использованные в работе

Наименование	Последовательность праймера (5'-3')
BSMV-CP-BamHI-P	GAGGATCCATGCCGAACGTTTCTTTGAC
BSMV-CP-M-SalI	TCGTCGACTCACGCTTCCTCGGCATC
BSMV-dN-P	AAACTCGAGATGGATTGGTGGGTCCACGTTAGAAGC
BS-M-Bam	GCGGATCCTCACGCTTCCTCGGCATCTG
BSMV-CP-P-Xho	GGCTCGAGATGCCGAACGTTTCTTTGACTG
BSMV-dC-M	AAAGGATCCTCACACTGGGAGTCTCGCACTCT
ВПЖТ-специфичный праймер	ATCAGCAATGTCCACATCCA
F-BOX-P	GGCACTCACAAACGTCTATTTC
F-BOX-M	ACCTGGGAGGCATCCTGCTTAT
TVCV RdRp-P	CTCGGAGTTCGCTAAAACCG
TVCV RdRp-M	GAACGGAGCATCATTTTGTAAGC

БО ВШМЯ с помощью праймеров BSMV-dN-P/BS-M-Bam и BSMV-CP-P-Xho/BSMV-dC-M соответственно (таблица). ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами BamHI/XhoI и клонировали в вектор pCambia1300, несущий фрагмент генома ВПЖТ.

Агробактериальная инфильтрация растений *Nicotiana benthamiana*. Выращенные из семян растения *Nicotiana benthamiana* содержали в условиях теплицы при 16-часовом дне, с колебаниями температуры день/ночь – 25/22 °С. Культуру клеток *Agrobacterium tumefaciens* (штамм C58C1, любезно предоставленный доктором J. Schiemann, Кведлинбург, Германия), несущую векторную конструкцию, выращивали в среде LB, содержащей 5 г/л NaCl, 5 г/л дрожжевого экстракта («Sigma», США), 10 г/л триптона («Sigma», США), с добавлением соответствующих антибиотиков, 20 мкМ ацетосирингона («Sigma», США) и 10 мМ MES («Sigma», США), при качении 190 об./мин на шейкере-инкубаторе ES-20 («BioSan», Латвия) в течение 15–17 ч при температуре 28 °С. Затем клетки *A. tumefaciens* осаждали в течение 5 мин при комнатной температуре при 3000 об./мин в центрифуге MiniSpin («Eppendorf», Германия), полученный осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 10 мМ MES, 10 мМ MgCl₂ и 150 мМ ацетосирингона, и инкубировали 3 ч при комнатной температуре. Полученную суспензию разводили буферным раствором до оптической плотности 0,2–0,4 (при λ = 600 нм). Нижнюю поверхность двух листьев нижнего яруса растений возрастом 4 недели инфильтрировали клеточной суспензией с помощью шприца без иголки.

Окрашивание листьев диаминобензидином (ДАБ). Лист растения в растворе ДАБ («Sigma», США) с концентрацией 1 мг/мл (рН 3,0) поме-

щали в эксикатор и подвергали воздействию вакуума в течение 5 мин для проникновения раствора в ткани. Лист инкубировали в растворе в течение 4–5 ч при постоянном перемешивании 80–100 об./мин на орбитальном шейкере («BioSan», Латвия). По окончании инкубации раствор ДАБ удаляли и заменяли раствором для обесцвечивания (этиловый спирт : уксусная кислота : глицерин = 3 : 1 : 1), в котором выдерживали до полного разрушения хлорофилла в листе.

Количественная ПЦР в реальном времени. Суммарную клеточную РНК выделяли из образцов листьев с помощью набора ExtractRNA («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически. Первую цепь кДНК получали с использованием набора реактивов MMVL RT kit («Евроген», Россия). Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями производителя, используя Oligo(dT)-праймер или ВПЖТ-специфичный праймер (таблица). Относительный уровень вирусной РНК определяли методом ПЦР в реальном времени с помощью амплификатора Quant Studio 3 Real-Time PCR System («Thermo Fisher Scientific», США) и коммерческой смеси для ПЦР qPCRmix-HS («Евроген», Россия). Ген *F-box* (праймеры F-BOX-P/F-BOX-M, таблица) использовали в качестве конститутивно экспрессирующегося гена для нормирования уровня вирусной РНК (праймеры TVCV RdRp-P/TVCV RdRp-M, таблица). Относительный уровень РНК рассчитывали с помощью метода ΔC_t по формуле 2^{-ΔC_t}. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов и были проанализированы с использованием *t*-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости принимали равным 0,01.

Вестерн-блот-анализ. Образцы листьев замораживали в жидком азоте, растирали пестиком в пробирке эппендорф, добавляли буфер для нанесения на гель следующего состава: 2% Ds-Na, 0,06 М Tris-HCl («Sigma», США) (pH 6,8), 0,001% бромфенолового синего, 5% (v/v) β-меркаптоэтанола («Sigma», США), 30% (v/v) глицерина («Sigma», США); далее нагревали в течение 5 мин при 95 °С. Полученный лизат осветляли центрифугированием и анализировали с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза в 15%-ном геле методом Лэммли; затем белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм (Protran BA 85, «GE Healthcare», США). Далее мембрану инкубировали в 0,05 М Tris-HCl-буфере с pH 7,2–7,4, содержащем 5% сухого молока («Sigma», США) и 0,05% (v/v) Tween 20 («Serva», Германия). Для детекции использовали кроличьи первичные антитела в разведении 1 : 10 000, специфичные к БО ВШМЯ, и коммерческие козы вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена в разведении 1 : 10 000, («Sigma», США). Для проявления использовали систему ECL («GE Healthcare», США).

Выделение препарата вируса из зараженных листьев растений. Системные листья растений, имеющих характерные симптомы вирусной инфекции, собирали на 21-й день после заражения. Полученный растительный материал гомогенизировали, растирая в жидком азоте в ступке с добавлением 0,3 М глицин-КОН-буфера в соотношении 1 : 3 (m/v) (pH 7,5). Для удаления клеточного дэбриса экстракт фильтровали и центрифугировали при 12 000 об./мин в течение 30 мин на центрифуге Beckman J-21 («Beckman», США) при 4 °С. В супернатант добавляли Triton X-100 («Sigma», США) до 1% (v/v), инкубировали 20 мин, в полученный раствор вносили полиэтиленгликоль («Sigma», США) до 2,5% (m/m), NaCl до 5% (m/m) и выдерживали при 4 °С в течение ночи. На следующий день раствор центрифугировали при 10 000 об./мин на центрифуге Beckman J-21 («Beckman», США) в течение 20 мин при 4 °С. Осадок ресуспендировали в 0,025 М Tris-HCl (pH 7,5) и осветляли путем центрифугирования при 10 000 об./мин в течение 15 мин при 4 °С. Полученный препарат вируса характеризовали с использованием физических методов.

Измерение спектров кругового дихроизма. Спектры кругового дихроизма (КД) вирусных препаратов измеряли на дихрографе «Chirascan» («Applied Photophysics», Великобритания) при комнатной температуре в кюветах с длиной оптического пути 1 мм в 5 мМ фосфатном буфере (pH 7,5). Область измерения спектров 190–260 нм. Спектры КД записывали на скорости 0,5–1,0 нм/с с вычетом базовой линии. Измеренные спектры

обрабатывали с использованием стандартного пакета программного обеспечения, поставляемого с прибором. Спектры КД представлены как среднее трех независимых экспериментов. Для каждого из вирусов использовали не менее трех различных препаратов.

Поверхностный зета-потенциал и динамическое лазерное светорассеяние (ДЛС). Определение гидродинамического диаметра и измерение поверхностного зета-потенциала проводили на установке Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments Ltd.», Великобритания) с He-Ne-лазером (633 нм, 10 мВт) в качестве источника света. Температуру образцов поддерживали в пределах 0,1 °С при помощи системы термостатирования Пельтье. Измерения светорассеяния проводили под углом 173°. Детекцию и обработку автокорреляционных функций производили при помощи ПО Dispersion Technology Software (DTS) version 5.10 («Malvern Panalytical», Великобритания). Для измерения использовали обычные полистироловые кюветы с длиной оптического пути 10 мм, объем образца в кювете составлял 1 мл.

Приготовление ультратонких срезов клеток мезофилла листа *Nicotiana benthamiana*. Небольшой фрагмент системного листа зараженного растения *N. benthamiana* промывали 100 мМ фосфатным буфером (pH 7,4) с 2%-ной сахарозой. С помощью лезвия фрагмент нарезали на полоски 1 × 2 мм. Полоски помещали в 2,5%-ный раствор глутарового альдегида («Sigma», США) в 100 мМ фосфатном буфере с 2%-ной сахарозой на 2,5–3 ч. Затем полоски промывали бидистиллированной водой и переносили в 2%-ный водный раствор тетраоксида осмия на 2 ч. Далее образцы промывали водой и последовательно обезвоживали в 50%-ном спирте, 70%-ном спирте с 2%-ным уранилацетатом («Polysciences», США) в течение ночи для усиления контраста, 80%-ном, 96%-ном спирте и ацетоне. Образцы помещали в смесь ацетона и Эпона (3 : 1) на 2 ч, смесь ацетона и Эпона (1 : 1) – на 1 ч, смесь ацетона и Эпона (1 : 3) – на 2 ч, и в чистый Эпон – на день. Далее образцы выдерживали 24 ч в термостате при 37 °С, затем – 48 ч при 60 °С для полимеризации Эпона. Ультратонкие срезы ~100 нм, полученные при помощи ультратома LKB («Bromma», Швеция), окрашивали реактивом Рейнолдса [24] и анализировали в электронном микроскопе JEM-1400, («JEOL», Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование инфекционных свойств химерного вируса ВПЖТ(БО^{ВШМЯ}) в растениях *N. benthamiana*. Путем замены гена БО ВПЖТ на ген БО ВШМЯ

в инфекционном клоне кДНК ВПЖТ в составе бинарного вектора на основе pCambia (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585>) была создана химерная конструкция ВПЖТ(БО^{ВШМЯ}). Растения *N. benthamiana* инфильтрировали бактериями *Agrobacterium tumefaciens*, несущими данную конструкцию. Контролем служили растения, инфильтрированные агробактерией, несущей конструкцию ВПЖТ дикого типа (дтВПЖТ).

дтВПЖТ вызывал мягкие симптомы, впервые появившиеся на верхних системных (неинфильтрированных) листьях на 10-й день после инфильтрации (дпи). Позднее рост зараженных растений останавливался и наблюдалась сильная деформация верхних листьев (рис. 1). Симптомы на системных листьях растений, зараженных химерным вирусом ВПЖТ(БО^{ВШМЯ}), образовывались с некоторой задержкой: на 13-й дпи появлялась деформация верхних листьев с последующим развитием небольших хлорозов и морщинистости (рис. 1). Инфильтрированные листья демонстрировали лишь незначительное скручивание. В качестве отрицательного контроля был использован инфекционный клон кДНК ВПЖТ, в котором ген собственного БО вируса был заменен на ген зеленого флуоресцентного белка. В растениях, агроинфильтрированных полученной конструкцией, флуоресценция наблюдалась только в инфильтрированных листьях. На 21-й дпи симптомы и флуоресценция на системных листьях отсутствовали (данные не показаны).

Результаты вестерн-блот-анализа на присутствие БО ВШМЯ и ПЦР-анализа в реальном

времени для оценки количества РНК ВПЖТ в верхних неинкулированных листьях хорошо согласуются с появлением симптомов у инфицированных растений (рис. 2, а и б). В листьях, инфильтрированных конструкцией ВПЖТ(БО^{ВШМЯ}), БО ВШМЯ определяли уже на 4-й дпи, тогда как в системных листьях — на 9-й дпи (рис. 2, а). Накопление РНК ВПЖТ в процессе инфекции химерным вирусом ВПЖТ(БО^{ВШМЯ}), по сравнению с заражением дтВПЖТ, было ниже почти в 2 раза — как в инфильтрированных листьях на 7-й дпи, так и в системных листьях на 14-й дпи (рис. 2, б и в).

В целом, эти данные свидетельствуют, что при заражении растений химерным тобамовирусом БО гордеивируса, который в норме не требуется для системного транспорта гордеивируса в растениях *N. benthamiana*, успешно комплементирует функцию БО тобамовируса, необходимого для системного транспорта тобамовируса по растению.

Инфекционные свойства мутантных вариантов химерного вируса. Для детального анализа роли БО ВШМЯ были созданы два варианта рекомбинантного генома с мутациями в гене БО ВШМЯ. Известно, что N- и C-концевые фрагменты БО как ВШМЯ, так и ВТМ, являются внутренне неупорядоченными, т.е. не обладающими уникальной вторичной или третичной структурой в физиологических условиях, и экспонируются на поверхности вирионов [4, 23, 25]. Считается, что эти участки могут играть основную роль в функциях БО, не связанных с инкапсидацией, благодаря их способности взаимодей-

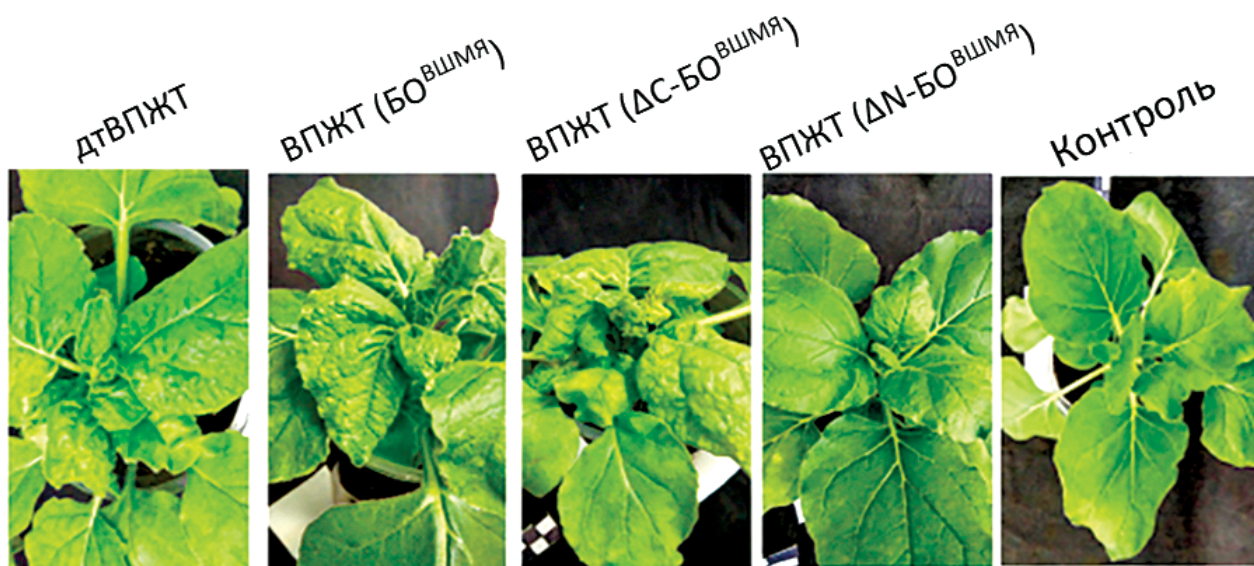


Рис. 1. Симптомы вирусной инфекции, выявляемые на растениях *N. benthamiana* на 14-й день после заражения дтВПЖТ, химерным вирусом ВПЖТ(БО^{ВШМЯ}) и химерными вирусами с делециями N- и C-концевых участков БО ВШМЯ (ВПЖТ(ΔN-БО^{ВШМЯ}) и ВПЖТ(ΔC-БО^{ВШМЯ}) соответственно) в сравнении со здоровым растением (контроль)

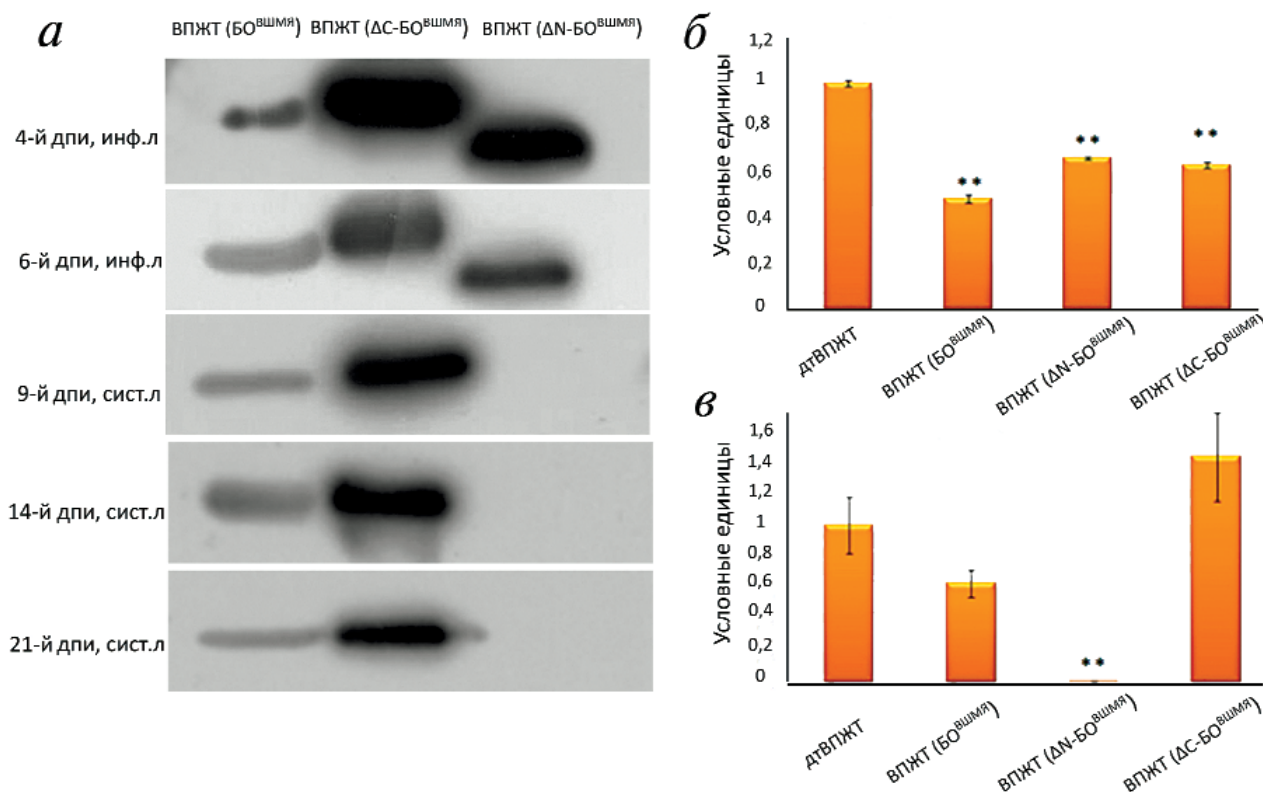


Рис. 2. Идентификация БО ВШМЯ и РНК ВПЖТ в инфицированных и системных листьях на различных сроках инфекции растений *N. benthamiana* химерным вирусом ВПЖТ БО^{VSMYA} и химерными вирусами с мутантным БО ВШМЯ (ВПЖТ(ΔN-BO^{VSMYA}) и ВПЖТ(ΔC-BO^{VSMYA})). *а* – Вестерн-блот-анализ уровня накопления БО ВШМЯ в растениях, зараженных химерным вирусом ВПЖТ(BO^{VSMYA}) и мутантами химерного вируса (ВПЖТ(ΔN-BO^{VSMYA}), ВПЖТ(ΔC-BO^{VSMYA})) на 4 и 6-й дни в инфицированных листьях и на 9, 14 и 21-й дни в системных листьях; анализ уровня накопления РНК ВПЖТ с помощью ПЦР в реальном времени в инфицированных листьях растений *N. benthamiana* на 7 (*б*) и 14-й (*в*) дни. ** – Статистически достоверные изменения уровня накопления РНК ВПЖТ в сравнении с образцом, зараженным вирусом ΔN-VPJT. $p < 0,01$

ствовать с вирусными и клеточными факторами [3, 26].

Нами были созданы две конструкции на основе полногеномной копии кДНК ВПЖТ(BO^{VSMYA}), а именно мутант ВПЖТ(ΔN-BO^{VSMYA}), кодирующий БО ВШМЯ с делецией 30 аминокислотных остатков (а.о.) с N-конца, и мутант ВПЖТ(ΔC-BO^{VSMYA}), кодирующий БО ВШМЯ с делецией 22 а.о. с C-конца полипептида. Растения *N. benthamiana* были инфицированы агробактериями, несущими данные конструкции в составе полногеномной кДНК вируса. Симптомы на верхних неинфицированных листьях растений, зараженных ВПЖТ(ΔC-BO^{VSMYA}) появились на 10-й дни, на 3 дня раньше, чем сходные симптомы при инфекции химерным вирусом ВПЖТ(BO^{VSMYA}) (13-й дни). Интересно, что появление симптомов у данного мутанта и вируса дикого типа совпадало по времени. К 17-му дни симптомы полностью проявлялись на растениях в виде розетчатости верхних листьев, редких хлорозов и карликовости инфицированных растений (рис. 1). В то же время на листьях,

инфицированных конструкцией ВПЖТ(ΔN-BO^{VSMYA}), на 6-й дни наблюдалось образование некрозов (рис. 3, *а*), характерных для ГО, а симптомы системной инфекции не были обнаружены (рис. 1).

Количественный анализ РНК ВПЖТ в инфицированных листьях на 7-й дни и системных листьях на 14-й дни показал, что в случае инфекции ВПЖТ(ΔC-BO^{VSMYA}) количество вирусной РНК было выше, чем при инфекции ВПЖТ(BO^{VSMYA}) (рис. 2, *б* и *в*). Эти данные подтверждаются результатами вестерн-блот-анализа с антителами против БО ВШМЯ: на всех сроках инфекции количество ΔC-BO ВШМЯ существенно превышало количество БО ВШМЯ (рис. 2, *а*). Напротив, при инфекции ВПЖТ(ΔN-BO^{VSMYA}) и белок, и РНК ВПЖТ были обнаружены только в инфицированных, но не в системных листьях (рис. 2, *а–в*).

Для того чтобы выяснить природу некрозов, образующихся при заражении мутантом ВПЖТ(ΔN-BO^{VSMYA}) (рис. 3, *а*), инфицированные листья были окрашены ДАБ на 4-й дни,

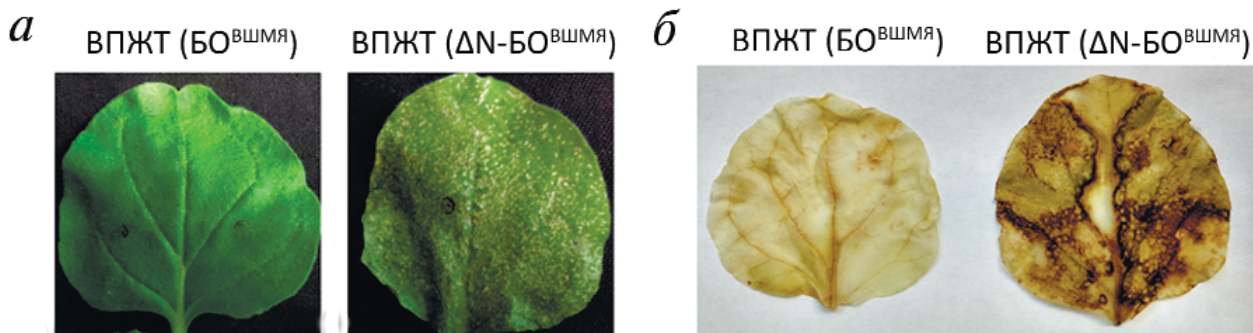


Рис. 3. Симптомы вирусной инфекции на растениях *N. benthamiana*, зараженных ВПЖТ(ΔN-BO^{ВШМЯ}). *а* – Развитие некротических повреждений на инфицированных листьях на 6-й дни; *б* – выявление активных форм кислорода при окраске ДАБ листьев, инфицированных ВПЖТ(BO^{ВШМЯ}) и ВПЖТ(ΔN-BO^{ВШМЯ}), на 4-й дни

когда некротическое поражение еще не сформировались. ДАБ широко используется для обнаружения *in situ* активных форм кислорода в растениях, поскольку он окисляется перекисью водорода с формированием темно-коричневого осадка [27, 28]. Обработка ДАБ листьев, инфицированных ВПЖТ(ΔN-BO^{ВШМЯ}), но не ВПЖТ(BO^{ВШМЯ}), приводила к яркому окрашиванию (рис. 3, б), таким образом подтверждая, что наблюдаемый некроз является результатом ГО, поскольку известно, что развитию ГО предшествует накопление активных форм кислорода в тканях растений [29].

Физико-химическая характеристика мутантного химерного вируса ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}). Мы изучили физико-химические свойства мутантного химерного вируса ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}), который накапливался в инфицированных и системных листьях в больших количествах, чем химерный вирус с полноразмерным BO^{ВШМЯ}. Препараты химерного вируса и мутантного химерного вируса выделяли из системных симптоматических листьев зараженных растений на 21-й дни.

Спектр поглощения препарата ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}) имел выраженный максимум в районе 260 нм, указывающий на значительную долю (>5%) нуклеиновых кислот в препарате (данные не показаны). Измерение спектра КД в ближнем ультрафиолетовом диапазоне препарата ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}) продемонстрировал характерный для спиральных вирусов растений спектр, богатый альфа-спиральными элементами и имеющий два отрицательных максимума в районе 208 и 222 нм. Наложение спектра КД ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}) на спектр КД ВПЖТ(BO^{ВШМЯ}) показало их соответствие, что указывает на отсутствие существенного нарушения вторичной структуры белка в составе вириона в случае ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}) (рис. 4, а).

Поверхностный зета-потенциал вирусных частиц составлял –28 мВ (рис. 4, б) и был сходен

с аналогичным показателем при тех же значениях рН для вирионов ВТМ дикого типа (–30 мВ). Таким образом, удаление C-концевого фрагмента BO^{ВШМЯ} не оказывало значительного влияния ни на структуру белка, ни на его поверхностные свойства.

В то же время измерение гидродинамического размера вирусных частиц, образуемых ΔC-BO^{ВШМЯ}, методом динамического лазерного светорассеяния показало наличие в препарате двух пиков: одного размером ~100 нм и другого размером ~800 нм (рис. 4, в). Такой гидродинамический диаметр частиц указывает на то, что в растворе частицы существуют в виде крупных структур (агрегатов). Гидродинамический диаметр вирионов, формируемых химерным тобамовирусом, составляет ~35 нм (данные не показаны).

Анализ препарата частиц ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}) методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) показал присутствие нитевидных структур толщиной ~10 нм нерегулярной длины (от 100 до нескольких сотен нм) со слабой электронной плотностью, образующих сетевые скопления (данные не показаны). Для идентификации выявленных структур, существенно отличающихся от структуры палочковидных вирионов ВШМЯ, мы изучили с помощью ТЭМ срезы листьев, зараженных ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}) и ВПЖТ(BO^{ВШМЯ}). В сравнении с толщиной вирусных частиц, формируемых тобамовирусом дикого типа или химерным тобамовирусом, которая составляет ~20 нм (рис. 5, а) [23], обнаруживаемые на срезах гибкие, зачастую агрегированные вирусные частицы имели толщину ~10 нм (рис. 5, б). Несмотря на явную аномальность наблюдаемых частиц, тот факт, что они обнаруживаются не только в очищенных препаратах, но и внутри растительных клеток указывает на их нативную, а не артефактную природу.

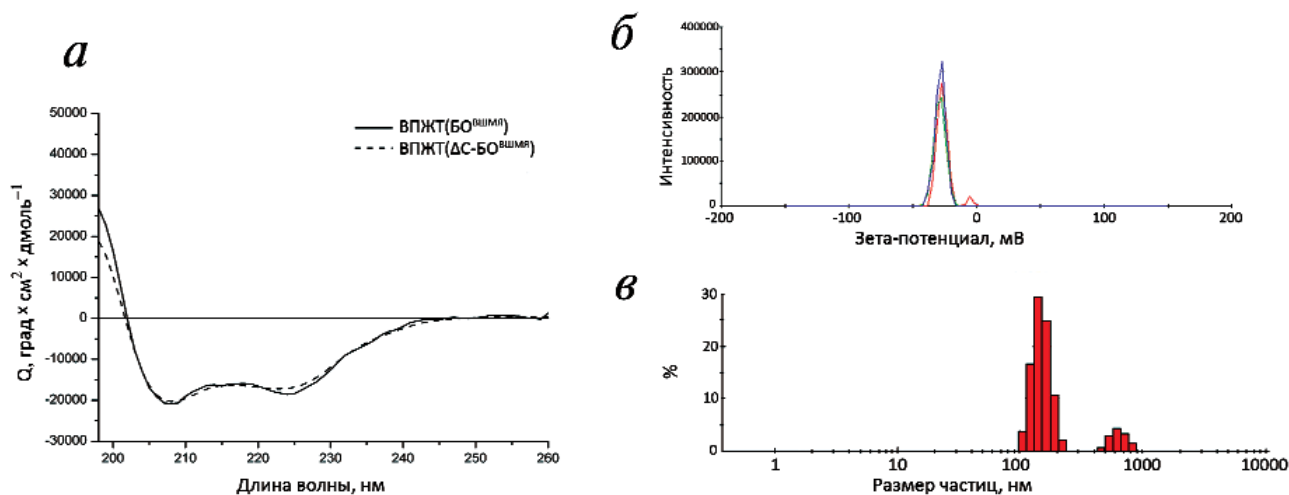


Рис. 4. Физико-химическая характеристика мутантного химерного вируса ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}). *a* – Спектры кругового дихроизма препаратов химерного ВПЖТ(BO^{ВШМЯ}) и мутантного вируса ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}); *б* – поверхностный зета-потенциал вирусных частиц ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}). Разным цветом обозначены три независимых измерения; *в* – гидродинамический диаметр вирусных частиц ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}), определенный методом ДЛС

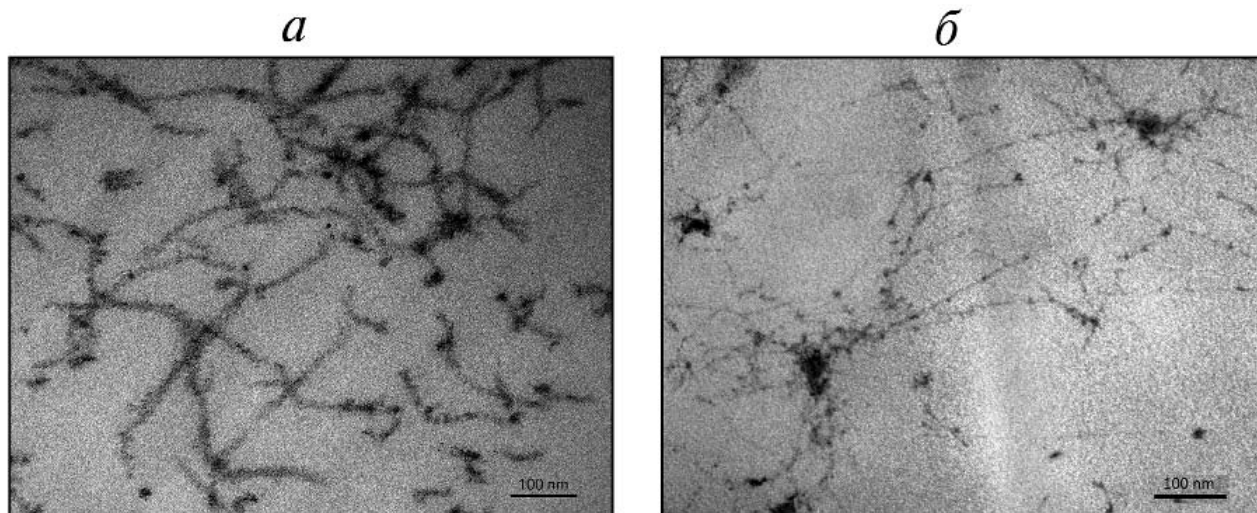


Рис. 5. Электронная микрофотография ультратонких срезов системных симптоматических листьев *N. benthamiana*, зараженных ВПЖТ(BO^{ВШМЯ}) (*a*) и ВПЖТ(ΔC-BO^{ВШМЯ}) (*б*)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы показали, что ген *BO* ВШМЯ может заменить собственный ген *BO* тобамовируса в геноме ВПЖТ без значительных потерь в инфекционности и способности к дальнему транспорту химерного вируса по сравнению с дтВПЖТ. Этот факт представляется достаточно неожиданным, т.к. известно, что *BO* гордеивирусов не требуется для транспорта ВШМЯ по флоэме [19–21]. Однако полученные данные показывают, что *BO* ВШМЯ может обеспечивать эту функцию в контексте рекомбинантного вирусного генома. Подобное функциональное

переключение с вирионной на невирионную транспортную форму вирусного генома напоминает роль *BO* в дальнем транспорте родственного гордеивирусам вируса метельчатости верхушек картофеля (ВМВК) из рода *Potomovirus*: геномная РНК3 ВМВК перемещается по флоэме в форме модифицированного вириона, в то время как РНК1 и РНК2 – в форме РНП-комплекса [30].

Как показано ранее для гордеивирусов, фенотип инфекции и спектр заражаемых растений зависят от сложных взаимодействий нескольких неструктурных вирусных белков, таких как гамма а (субъединица РНК-репликазы), гамма б

(супрессор сайленсинга и фактор системного транспорта) и транспортный белок, кодируемый первым геном тройного блока транспортных генов [19, 22]. Считается, что эти вирусные белки влияют на репликацию генома, регуляцию уровня экспрессии вирусных генов и/или транспорт вируса, прямо или опосредованно. С другой стороны, в ходе тобамовирусной инфекции большинство этих функций выполняет БО. Например, БО тобамовирусов принимает участие во флоэмном транспорте [30] и играет двойную роль в регуляции защитного ответа растения-хозяина, с одной стороны выступая в качестве элиситора ГО [12–16, 31, 32], и с другой стороны, принимая участие в подавлении защитной системы растения [11, 17, 18].

Способность БО ВШМЯ эффективно выполнять функции БО тобамовируса в химерном тобамовирусе может иметь два взаимодополняющих объяснения. Основная роль БО тобамовируса — это инкапсидация вирусной геномной РНК и ее защита в процессе транспорта по флоэме. Действительно, мутации в области геномной РНК ВТМ, ответственной за иницирование сборки вириона, блокируют не только формирование вирусных частиц, но и дальний транспорт вируса [9]. Ранее было продемонстрировано, что химерный тобамовирус ВТМ, инкапсидированный полноразмерным БО ВШМЯ, может формировать морфологически правильные вирионы, неотличимые от вирионов ВШМЯ дикого типа, и таким образом, эффективно защищать РНК тобамовируса от деградации [23]. Второе объяснение заключается в том, что БО выполняет не только структурную функцию. БО ВТМ необходим для загрузки вирусного генома во флоэму: мутант ВТМ без гена *BO* может достичь только клеток васкулярной паренхимы минорных жилок листа и не обнаруживается в клетках-спутницах, вовлеченных в загрузку вируса в ситовидные элементы флоэмы [10]. Весьма вероятно, что, эффективность замены БО тобамовируса на БО гордеивируса обусловлена структурным сходством между этими БО, наиболее выраженном в области коровых альфа-спиралей [4]. Структурным сходством можно также объяснить участие БО ВШМЯ в регуляции защитного ответа растения, которая проявляется в виде ГО в случае мутанта с делетированным неупорядоченным *N*-концевым участком БО. Действительно, показано, что участок, ответственный за активность БО ВТМ как элиситора ГО, расположен в районе коровых альфа-спиралей, экспонированных на поверхности вирионов [12]. Мы предполагаем, что структурно сходная область БО ВШМЯ становится более доступной для взаимодействующих клеточных

факторов при делеции *N*-конца БО в химерном тобамовирусе, что и приводит к развитию ГО. Аналогичный эффект наблюдали для делеционных мутантов других вирусов растений: например, делеция *C*-конца БО ВТМ крестоцветных сопровождалась развитием ГО в растениях *Arabidopsis thaliana* [33], а делеция *N*-конца БО бромовируса мозаики ковра — к ГО в зараженных растениях *Chenopodium quinoa* [35].

Неожиданным оказался и тот факт, что удаление 22 а.о., входящих в состав неупорядоченного *C*-концевого участка БО ВШМЯ, сопровождалось заметным увеличением инфекционности химерного вируса. Это проявлялось в раннем появлении симптомов на системных листьях и повышении концентрации мутантного БО и вирусной РНК в инфицированных и системных листьях в сравнении с инфекцией химерным вирусом с полноразмерным БО. Характеристика физико-химических свойств препаратов, выделенных из зараженных растений, показала, что удаление *C*-концевого фрагмента БО ВШМЯ не оказывает значительного влияния ни на структуру белка (спектр и КД), ни на его поверхностные свойства (зета-потенциал) по сравнению с БО ВШМЯ дикого типа. Однако в растворе эти вирусные частицы формируют высокомолекулярные агрегаты. Электронная микроскопия частиц на срезах зараженных клеток показала, что они имеют аномально низкую толщину — ~10 нм в сравнении с толщиной вирусных частиц, формируемых тобамовирусом дикого типа или химерным тобамовирусом, которая составляет ~20 нм. Известно, что *C*-концевой неупорядоченный фрагмент БО не вовлечен в формирование межсубъединичных взаимодействий в зрелом вирионе [23]. Однако нельзя исключить, что он участвует в инициации или начальных стадиях сборки вириона, и его отсутствие приводит к образованию aberrантных вирионов (РНП-комплексов). В целом характеристики анализируемых частиц (морфология и параметры) сходны с характеристиками нитевидных спиральных вирусов и с предполагаемой невирионной транспортной формой вирусного генома — РНП-комплексами, формируемыми *in vitro* транспортными вирусными белками и вирусными РНК (параметры, склонность в агрегации) [36–38]. Полученные данные свидетельствуют о значимости *C*-концевого участка БО для правильной сборки вириона. Вместе с тем aberrантные вирионы способны обеспечить эффективное распространение РНК химерного тобамовируса по растению, а мутантный БО ВШМЯ — все возможные функции БО в процессе межклеточного (ближнего) транспорта и дальнего транспорта по флоэме. Вероятно, также, что именно

С-концевая часть молекулы БО ВШМЯ распознается защитными системами растения, а ее удаление способствует частичному «уходу» вируса от защитного ответа растения-хозяина. Экспериментальная система, созданная в данной работе, может быть использована для дальнейшего изучения различных стратегий системного транспорта палочковидных вирусов растений и основных защитных механизмов растения.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 14-24-0007, создание генно-инженерных конструкций, заражение и экспериментальный анализ растений, анализ физико-химических характеристик вирусных белков). Работа А.Г. Соловьева поддержана РФФИ (грант № 15-04-03922, биоинформатический анализ).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности

Авторы благодарят Курчашову С.Ю. за помощь в подготовке срезов инфицированных листьев и Прусова А.Н. за содействие в получении электронных микрофотографий.

Вклад авторов

Калинина Н.О. и Макаров В.В. участвовали в планировании экспериментов, обсуждении результатов и написании статьи. Макарова С.С. получила генно-инженерные конструкции и выполнила все основные эксперименты на зараженных растениях. Махотенко А.В. и Хромов А.В. участвовали в постановке ПЦР-анализа в реальном времени. Соловьев А.Г. и Скурат Е.В. осуществили дизайн мутантных вариантов химерного вируса и принимали участие в обсуждении статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ni, P., and Kao, C.C. (2013) Non-encapsidation activities of the capsid proteins of positive-strand RNA viruses, *Virology*, **446**, 123–132.
- Weber, P.H., and Bujarski, J.J. (2015) Multiple functions of capsid proteins in (+) stranded RNA viruses during plant–virus interactions, *Virus Res.*, **22**, 140–149.
- Makarov, V.V., and Kalinina, N.O. (2016) Structure and noncanonical activities of capsid proteins of helical plant viruses, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1–18.
- Solovyev, A.G., and Makarov, V.V. (2016) Helical capsids of plant viruses: architecture with structural lability, *J. Gen. Virol.*, **97**, 1739–1754.
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K., and Schaad, M.C. (1996) Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants, *Plant Cell*, **8**, 1669–1681.
- Ryabov, E.V., Robinson, D.J., and Taliansky, M.E. (1999) A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1212–1217.
- Bendahmane, M., Szecsi, J., Chen, I., Berg, R.H., and Beachy, R.N. (2002) Characterization of mutant tobacco mosaic virus capsid protein that interferes with virus cell-to-cell movement, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3645–3650.
- Asurmendi, S., Berg, R.H., Koo, J.C., and Beachy, R.N. (2004) Coat protein regulates formation of replication complexes during tobacco mosaic virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1415–1420.
- Saito, T., Yamanaka, K., and Okada, Y. (1990) Long distance movement and viral assembly of tobacco mosaic virus mutants, *Virology*, **176**, 329–336.
- Ding, S.W., Li, W.X., and Symons, R.H. (1995) A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement, *EMBO J.*, **14**, 5762–5772.
- Conti, G., Zavallo, D., Venturuzzi, A.L., Rodriguez, M.C., Crespi, M., and Asurmendi, S. (2017) TMV induces RNA decay pathways to modulate gene silencing and disease symptoms, *Plant J.*, **89**, 73–84.
- Culver, J.N. (2002) Tobacco mosaic virus assembly and disassembly: determinants in pathogenicity and resistance, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **40**, 287–308.
- Taraporewala, Z.F., and Culver, J.N. (1997) Structural and functional conservation of the tobamovirus capsid protein elicitor active site, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **10**, 597–604.
- Huh, S.U., Choi, L.M., Lee, G.J., Kim, Y.J., and Paek, K.H. (2012) *Capsicum annuum* WRKY transcription factor d (CaWRKYd) regulates hypersensitive response and defense response upon tobacco mosaic viral infection, *Plant Sci.*, **197**, 50–58.
- Gilardi, P., Garcia-Luque, I., and Serra, M.T. (2004) The coat protein of tobamovirus acts as elicitor of both L2 and L4 gene-mediated resistance in *Capsicum*, *J. Gen. Virol.*, **85**, 2077–2085.
- Berzal-Herranz, A., de la Cruz, A., Tenllado, F., Diaz-Ruiz, J.R., Lopez, L., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra, M.T., and Garcia-Luque, I. (1995) The Capsicum L3 gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein, *Virology*, **209**, 498–505.
- Conti, G., Rodriguez, M.C., Manacorda, C.A., and Asurmendi, S. (2012) Transgenic expression of tobacco mosaic virus capsid and movement proteins modulate plant basal defense and biotic stress responses in *Nicotiana tabacum*, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **10**, 1370–1384.
- Rodriguez, M., Conti, G., Zavallo, D., Manacorda, C., and Asurmendi, S. (2014) TMV Cg capsid protein stabilizes DELLA proteins and in turn negatively modulates salicylic acid-mediated defense pathway during *Arabidopsis thaliana* viral infection, *BMC Plant Biol.*, **14**, 210–216.
- Jackson, A.O., Lim, H.S., Bragg, J., Ganesan, U., and Lee, M.Y. (2009) Hordeivirus replication, movement, and pathogenesis, *Annu. Rev. Phytopathol.*, **47**, 385–422.
- Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., Jackson, A.O., and Gilmer, D. (2010)

- Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **23**, 1231–1247.
21. Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., and Revers, F. (2013) Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses, *Front. Plant Sci.*, **4**, 154.
 22. Lee, M.Y., Yan, L., Gorter, F.A., Kim, B.Y., Cui, Y., Hu, Y., Yuan, C., Grindheim, J., Ganesan, U., Liu, Z., Han, C., Yu, J., Li, D., and Jackson, A.O. (2012) *Brachypodium distachyon* line Bd3-1 resistance is elicited by the barley stripe mosaic virus triple gene block 1 movement protein, *J. Gen. Virol.*, **93**, 2729–2739.
 23. Clare, D.K., Pechnikova, E.V., Skurat, E.V., Makarov, V.V., Sokolova, O.S., Solovyev, A.G., and Orlova, E.V. (2015) Novel inter-subunit contacts in barley stripe mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy, *Structure*, **23**, 1815–1826.
 24. Edward, S., and Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J. Cell Biol.*, **17**, 208–212.
 25. Makarov, V.V., Skurat, E.V., Semenyuk, P.I., Abashkin, D.A., Kalinina, N.O., Arutyunyan, A.M., Solovyev, A.G., and Dobrov, E.N. (2013) Structural lability of Barley stripe mosaic virus virions, *PLoS One*, **8**, e60942.
 26. Xue, B., Blocquel, D., Habchi, J., Uversky, A.V., Kurgan, L., Uversky, V.N., and Longhi, S. (2014) Structural disorder in viral proteins, *Chem. Rev.*, **114**, 6880–6911.
 27. Daudi, A., and O'Brien, J. (2012) Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves, *Bio. Protoc.*, **2**, e263.
 28. Mehdy, M.C. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens, *Plant Physiol.*, **105**, 467–472.
 29. Conti, G., Rodriguez, M.C., Manacorda, C.A., and Asurmendi, S. (2012) Transgenic expression of tobacco mosaic virus capsid and movement proteins modulate plant basal defense and biotic stress responses in *Nicotiana tabacum*, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **10**, 1370–1384.
 30. Solovyev, A.G., and Savenkov, E.I. (2014) Factors involved in the systemic transport of plant RNA viruses: the emerging role of the nucleus, *J. Exper. Bot.*, **65**, 1689–1697.
 31. Conti, G., Rodriguez, M.C., Venturuzzi, A.L., and Asurmendi, S. (2017) Modulation of host plant immunity by Tobamovirus proteins, *Ann. Bot.*, **119**, 737–747.
 32. Culver, J.N., Stubbs, G., and Dawson, W.O. (1994) Structure-function relationship between tobacco mosaic virus coat protein and hypersensitivity in *Nicotiana glauca*, *J. Mol. Biol.*, **242**, 130–138.
 33. Kurihara, Y., and Watanabe, Y.A. (2004) TMV-Cg mutant with a truncated coat protein induces cell death resembling the hypersensitive response in *Arabidopsis*, *Mol. Cells*, **17**, 334–339.
 34. Li, M., Li, P., Song, R., and Xu, Z. (2010) An induced hypersensitive-like response limits expression of foreign peptides via a recombinant TMV-based vector in a susceptible tobacco, *PLoS One*, **5**, e15087.
 35. Rao, A.L., and Grantham, G.L. (1995) Biological significance of the seven amino-terminal basic residues of brome mosaic virus coat protein, *Virology*, **211**, 42–52.
 36. Kim, S.H., MacFarlane, S., Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Ryabov, E.V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J.W., and Taliansky, M. (2007) Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11115–11120.
 37. Makarov, V.V., Makarova, S.S., Makhotenko, A.V., Obratsova, E.A., and Kalinina, N.O. (2015) *In vitro* properties of hordeivirus TGB1 protein forming ribonucleoprotein complexes, *J. Gen. Virol.*, **96**, 3422–3431.
 38. Kiselyova, O.I., Yaminsky, I.V., Karger, E.M., Frolova, O.Y., Dorokhov, Y.L., and Atabekov, J.G. (2001) Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein–RNA complexes formed *in vitro*, *J. Gen. Virol.*, **82**, 1503–1508.

NON-STRUCTURAL FUNCTIONS OF HORDEIVIRUS CAPSID PROTEIN IDENTIFIED IN PLANTS INFECTED BY A CHIMERIC TOBAMOVIRUS

S. S. Makarova¹, A. V. Makhotenko¹, A. V. Khromov¹, E. V. Skurat¹,
A. G. Solovyev^{2,3}, V. V. Makarov², and N. O. Kalinina^{2*}

¹ Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, 119991 Moscow, Russia; E-mail: stmakarova@gmail.com

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: kalinina@genebee.msu.ru

³ All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia; E-mail: solovyev@belozersky.msu.ru

Received August 1, 2018

Revision received September 12, 2018

Accepted September 12, 2018

Capsid proteins (CPs) of (+)RNA-containing plant viruses are multifunctional proteins involved in many stages of viral infection cycle, in addition to their main function of virus capsid formation. For example, the tobamoviral CP ensures virus systemic transport in plants and defines the virus-host interactions, thereby influencing the virus host range, virus infectivity, pathogenicity, and manifestation of infection symptoms. Hordeiviruses and tobamoviruses belong to the Virgaviridae family and have rod-shaped virions with a helical symmetry; their CPs are similar in structure. However, no non-structural functions of hordeiviral CPs have been described so far. In this study, we assayed possible non-structural functions of CP from the barley stripe mosaic virus (BSMV) (hordeivirus). To do this, the genome of turnip vein clearing virus (TVCV) (tobamovirus) was modified by substituting the *TVCV CP* gene with the *BSMV CP* gene or its mutants. We found that BSMV CP efficiently replaced TVCV CP at all stages of viral infection. In particular, BSMV CP performed the role of tobamoviral CP in the long-distance transport of the chimeric virus, acted as a hypersensitive response elicitor, and served as a pathogenicity determinant that influenced the symptoms of the viral infection. The chimeric tobamovirus coding for the C-terminally truncated BSMV CP displayed an increased infectivity and was transported in plants in a form of atypical virions (ribonucleoprotein complexes).

Keywords: plant viruses, chimeric tobamovirus, hordeivirus coat protein, transport, infection symptoms