

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-282

КСИЛОГЛЮКАН ЭНДОТРАНСГЛЮКОЗИЛАЗА/ГИДРОЛАЗА *NICOTIANA BENTHAMIANA* (NBXTH19) СОДЕРЖИТ ASN-СВЯЗАННЫЙ ГЛИКАН И УЧАСТВУЕТ В ОТВЕТЕ НА ВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ****NICOTIANA BENTHAMIANA* XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE NBXTH19 CONTAINS ASN-LINKED GLYCAN AND PARTICIPATES IN RESPONSE TO VIRAL INFECTION**Е. В. Шешукова¹, Н. М. Ершова¹, А. А. Антимонова^{1,2}, К. А. Камарова¹, Т. В. Комарова^{1,2}¹Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва²Московский государственный университет им. М. В. ЛомоносоваE. V. Sheshukova¹, N. M. Ershova¹, A. A. Antimonova^{1,2}, K. A. Kamarova¹, T. V. Komarova^{1,2}¹Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow²Lomonosov Moscow State University

✉ sheshukova@vigg.ru

Аннотация

Среди клеточных белков, участвующих в ответах растения на вирусную инфекцию, многие являются гликопротеинами, проходящими по пути традиционной секреции через эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи. Причем наличие N-связанных гликанов необходимо для их функционирования. В данной работе был проведен анализ белка NbXTH19 и экспериментально показано наличие в нем сайта N-гликозилирования.

Abstract

Many cellular proteins involved in plant responses to viral infections are glycoproteins, which are secreted via the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus where they undergo glycosylation. Additionally, the presence of N-linked glycans is crucial for their function. In this study, the NbXTH19 protein was examined, and an N-glycosylation site within it was experimentally confirmed.

Клеточная стенка (КС) является одним из наиболее важных защитных барьеров растительной клетки. Эта структура состоит из разнообразных полисахаридов, белков и пектина: он формирует матрикс, в котором находится сеть целлюлозно-ксилоглюкановых фибрилл. КС достаточно пластична благодаря различным ферментам, модифицирующим полисахаридно-пектиновую основу. Белки класса ксилоглюкан эндотрансглюкозилаза/гидролаз (ХТН) играют важную роль в изменении структуры КС. Показано, что ХТН участвуют в перестройке клеточной стенки во время роста и развития растения. Однако свежие данные четко указывают на то, что белки этого семейства принимают активное участие в ответах на стрессовые воздействия [1]. Также имеются свидетельства того, что ХТН могут быть вовлечены в ответ растительной клетки на вирусную инфекцию [2]. Тем не менее многообразие и многочисленность представителей этого семейства белков оставляет огромное поле для исследования их структурных и функциональных особенностей, а также роли в реакциях растений на различные виды стрессов. Ранее мы идентифицировали ксилоглюкан эндотрансглюкозилазу растения *Nicotiana benthamiana*, имеющую наибольшую степень сходства с ХТН5 *Arabidopsis thaliana* и ХТН18/19 *N. tabacum* и обозначаемую в дальнейшем NbXTH19. Показано, что экспрессия *NbXTH19* коррелирует с экспрессией клеточного фактора NbKPIIP, который вовлечен в регуляцию передачи ретроградных сигналов от хлоропластов в ядро, а также стимулирует репродукцию и межклеточный транспорт вируса табачной мозаики (ВТМ) в *N. benthamiana*, тем самым способствуя созданию благоприятных условий для эффективного развития инфекции. NbKPIIP содержит секреторный сигнальный пептид, направляющий его по пути традиционной секреции, а также три остатка аспарагина, присоединение гликанов к которым является необходимым для нормального функционирования данного белка [3]. В настоящей работе мы показали, что, согласно биоинформатическому анализу, последовательность NbXTH19 включает в себя 21-аминокислотный сигнальный пептид и сайт N-гликозилирования (Asn114). Для экспериментального подтверждения секреции и гликозилирования NbXTH19 мы использовали два подхода: 1) отщепление потенциального N-связанного гликана с помощью PNGase F, которая осуществляет энзиматическое отщепление N-связанных гликанов от белка, и оценка изменения подвижности белка в полиакриламидном геле; 2) замена остатка аспарагина на аланин в составе NbXTH19 и сравнение электрофорети-

* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 19-74-20031-П).

© Е. В. Шешукова, Н. М. Ершова, А. А. Антимонова, К. А. Камарова, Т. В. Комарова, 2024

ческой подвижности полученного мутантного варианта NbXTH19_N114A и NbXTH19, а также проверка его чувствительности к обработке PNGase F. Учитывая, что в растениях N-связанный гликан, как правило, содержит α 1,3-фукозу, присутствие которой делает гликаны недоступными для отщепления PNGase F, мы использовали трансгенные растения *N. benthamiana* с нокадауном генов фукозил- и ксилозил-трансферазы. В этих растениях осуществляли транзientную экспрессию конструкций, кодирующих NbXTH19 или NbXTH19_N114A, слитые с GFP, а затем проводили фракционирование растительного материала и обработку PNGase F. Вестерн-блот-анализ полученных экстрактов и детекция белка с помощью специфических антител против GFP показали, что 1) NbXTH19:GFP является чувствительным к PNGase F и меняет подвижность в геле в соответствии с ожидаемой после инкубации с PNGase F; 2) подвижность в геле NbXTH19_N114A:GFP не изменяется после обработки PNGase F. На основании полученных результатов мы заключили, что NbXTH19 направляется к месту конечной локализации по пути традиционной секреции через эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи, является гликопротеином, содержащим N-связанный гликан в позиции 114. NbXTH19 может играть роль партнера провирусного фактора NbKPILP, принимать участие в модификации КС и регуляции пропускной способности плазмодесма при вирусной инфекции.

Литература

1. Ishida K., Yokoyama R. Reconsidering the function of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family // J. Plant Res. 2022. Vol. 135, Iss. 2. P. 145–156.
2. Goyer A., Hamlin L., Crosslin J.M. et al. RNA-Seq analysis of resistant and susceptible potato varieties during the early stages of potato virus Y infection // BMC Genomics. 2015. Vol. 16, Iss. 1. P. 472.
3. Ershova N., Sheshukova E., Kamarova K. et al. Nicotiana benthamiana Kunitz peptidase inhibitor-like protein involved in chloroplast-to-nucleus regulatory pathway in plant-virus interaction // Front. Plant Sci. 2022. Vol. 13.