

На правах рукописи

Спеченкова Надежда Андреевна

**Идентификация белков, придающих устойчивость растениям
картофеля к комбинированным (биотическим и абиотическим) стрессам,
методом протеомного анализа**

1.5.6 – Биотехнология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в лаборатории функциональной геномики и протеомики растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Тальянский Михаил Эммануилович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией функциональной геномики и протеомики растений ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Морозов Сергей Юрьевич, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией генной инженерии вирусов отдела биохимии вирусов растений НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова.

Лазарев Василий Николаевич, д.б.н., доцент, заведующий лабораторией генной инженерии ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России.

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ)

Защита диссертации состоится «02» марта 2022 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

доктор физико-математических наук



Олейников В. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является первой незерновой продовольственной культурой как в мире, так и в Российской Федерации. В полевых условиях картофель, как и другие сельскохозяйственные культуры, одновременно подвергается различным абиотическим и биотическим стрессам, которые значительно снижают его урожайность и качество продукции.

Среди биотических факторов стресса вирусы являются основным классом патогенов, вызывающим около половины новых вспышек болезней растений. Важными для производства картофеля являются переносимые тлями потивирусы, такие как Y вирус картофеля (YBK/PVY). Поскольку картофель является холодолюбивой культурой, повышенные температуры представляют для него один из главных абиотических стрессов. Современные модели климата прогнозируют, что воздействие теплового стресса на картофель будет становиться все более распространенным, что может иметь разрушительные последствия для мирового производства картофеля. Кроме того, повышенные температуры могут значительно влиять на взаимодействия растений с патогенами и могут увеличить восприимчивость к вирусам, потенциально вызывающим дальнейшее снижение урожайности картофеля.

Для разработки эффективных подходов к защите растений от множественных стрессов определяющим является понимание механизмов формирования устойчивости. Растения картофеля как объект исследования, кроме очевидной экономической значимости этой культуры, имеют целый ряд преимуществ, а именно: наличие сортов, контрастных по устойчивости к патогенам и различным абиотическим факторам, полная последовательность генома, достаточно хорошая аннотация генома. Сравнение молекулярных ответов устойчивого и восприимчивого сортов на комбинированный стресс методами протеомики позволяет понять, какие стратегии, определяющие устойчивость сорта, реализуются в растениях этих генотипов и идентифицировать ключевые гены-мишени, перспективные для практического использования.

Настоящая работа посвящена изучению молекулярных механизмов, определяющих ответ растения картофеля на комбинированный стресс, вызванный биотическими (вирусная инфекция) и абиотическими (тепловое воздействие) факторами. Принимая во внимание ускорение процессов, способствующих глобальным изменениям климата, исследование молекулярных и генетических основ комбинированной устойчивости растений картофеля к стрессам различной природы является актуальным и более чем своевременным.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение методами протеомики и метаболомики влияния вирусной инфекции и повышенной температуры на защитный ответ сортов картофеля, контрастных по устойчивости к стрессам. Для достижения данной цели поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный количественный протеомный анализ устойчивого и восприимчивого сортов картофеля с использованием меточной протеомики (iTRAQ) в условиях комбинированного стресса (инфекция Y вирусом картофеля при повышенной температуре).

2. Выявить белки-кандидаты (и кодирующие их гены), вовлеченные в защитный ответ растений картофеля на комбинированный стресс.

3. Оценить содержание соответствующих метаболитов в контрастных по устойчивости к стрессам сортах картофеля в условиях вирусной инфекции и теплового стресса.

4. Оценить влияние обработки растений экзогенным метионином на их устойчивость к комбинированному стрессу.

5. Провести анализ молекулярных ответов контрастных по устойчивости к стрессам сортов картофеля, определяющих устойчивость/восприимчивость растений картофеля к индивидуальным и комбинированным биотическим и абиотическим стрессам.

Научная новизна и практическая значимость работы. В настоящей работе впервые проведен количественный сравнительный анализ протеома контрастных по отношению к стрессам сортов картофеля (Гала и Чикаго) в условиях индивидуальных и комбинированного стрессов. Выявлены группы дифференциально экспрессирующихся белков (ДЭБ). Для устойчивого сорта Гала в условиях индивидуального стресса (заражение Y вирусом картофеля) выявлено 43 и 189 ДЭБ на 8 и 14 дни после заражения, соответственно. В условиях комплексного стресса (вирусная инфекция и повышенная температура) количество ДЭБ возросло до 291 на 8 день и 399 на 14 день. Протеомный ответ восприимчивого сорта Чикаго выражен слабее: так в результате вирусного воздействия на фоне нормальной температуры идентифицировано 16 и 23 группы ДЭБ на 8 и 14 дни соответственно. При воздействии комбинированного стресса для этого сорта выявлено 64 ДЭБ на 8 день и 152 ДЭБ на 14 день после заражения.

Впервые выявлена важная роль ферментов метионинового цикла (МЦ) и свободного метионина в устойчивости растений картофеля к инфекции YBK. Показано, что в растениях устойчивого сорта Гала представленность основных ферментов, связанных с МЦ, повышается в ответ на вирусную инфекцию, независимо от температуры. Вместе с тем продемонстрировано, что значительное повышение восприимчивости растений картофеля сорта Чикаго (сорт, восприимчивый к биотическим и абиотическим стрессам) к вирусной инфекции при повышенной температуре коррелирует со снижением содержания основных ферментов МЦ и свободного метионина, а также снижением уровня экспрессии соответствующих генов. Обработка растений картофеля сорта Чикаго экзогенным метионином сопровождается восстановлением уровня накопления метаболитов МЦ и приводит к заметному повышению устойчивости растений восприимчивого сорта к инфекции YBK в условиях теплового стресса.

Полученные в результате настоящей работы данные о роли белков метионинового цикла в формировании устойчивости растений картофеля к инфекции YBK расширяют знания о механизмах взаимодействия между вирусами и растениями.

Выявленные гены ферментов МЦ могут рассматриваться как перспективные мишени при создании устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам сортов важных сельскохозяйственных культур (например, картофеля) с использованием методов классической селекции, а также с применением современных технологий геномного редактирования.

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментов с применением методов протеомики, транскриптомики и метаболомики, а также обработке и анализе полученных экспериментальных данных. Автор принимал участие в подготовке публикаций и представлении результатов исследования на отечественных и международных конференциях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Протеомные ответы контрастных по устойчивости к стрессам сортов картофеля заметно отличаются: у восприимчивого сорта ответ на вирусную инфекцию как на фоне нормальной, так и при повышенной температуре, количественно менее выражен, чем у устойчивого сорта.

2. Растения картофеля сорта Чикаго с повышенной восприимчивостью к инфекции Y-вирусом картофеля в условиях комбинированного стресса (вирусная инфекция и тепловой стресс) демонстрируют снижение уровня основных ферментов, относящихся к метиониновому циклу (МЦ) и сопряженному с ним фолатному циклу.

3. Устойчивость картофеля сорта Гала к вирусной инфекции коррелирует с увеличением уровня ферментов МЦ и содержания основных метаболитов МЦ.

4. В результате разнонаправленного изменения количества ферментов МЦ у контрастных сортов меняется соотношение основных метаболитов МЦ – SAM:SAH, известное как индекс метилирования, который отражает эффективность реакций трансметилирования: у устойчивого сорта в условиях комплексного стресса этот индекс возрастает, в то время как у восприимчивого снижается.

5. Обработка восприимчивого сорта экзогенным метионином, одним из метаболитов МЦ, приводит к восстановлению уровня накопления S-аденозилметионина, увеличению соотношения SAM:SAH и способствует значительному повышению устойчивости растений к вирусной инфекции в условиях теплового стресса.

6. Существует функциональная связь между обусловленной температурой восприимчивостью растений к вирусной инфекции и функционированием МЦ: устойчивость растений картофеля к заражению Y вирусом картофеля может регулироваться уровнем внутриклеточных метаболитов МЦ, который определяет эффективность процессов метилирования.

Публикации и апробация работы. По теме диссертационной работы опубликовано 3 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертации. Материалы диссертации представлены на 3 конференциях: 44-й конгресс FEBS (2019, Краков, Польша), XXXIII зимняя молодежная научная школа (2020, Москва, Россия) и XX всероссийская конференция молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (2020, Москва, Россия).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 141 странице машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы и приложения. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 5 таблицами. Список литературы содержит 137 цитированных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Динамика накопления вирусной РНК отличается у контрастных сортов картофеля

На первых стадиях изучения влияния вирусной инфекции и теплового стресса были отобраны контрастные по устойчивости сорта картофеля, с которыми проводились опыты по заражению PVY на фоне нормальной и повышенной температуры.

Сорт Чикаго характеризуется повышенной восприимчивостью к вирусным заболеваниям и тепловому стрессу. Начиная со второй недели опыта, заражённые растения демонстрировали симптомы вирусного заболевания, такие как морщинистость листьев, а при воздействии повышенной температуры – волнистость краёв листовой пластинки (Рис.1А). Также для этого сорта, начиная с 14 дня после заражения (dpi), отмечено значительное повышение уровня вирусной РНК в системно инфицированных листьях (Рис.2А). При нормальной температуре уровень накопления вирусной РНК после второй недели оставался примерно на одной позиции и не изменялся, в то время как при тепловом стрессе вирусная нагрузка увеличивалась в десятки раз (Рис.2А).

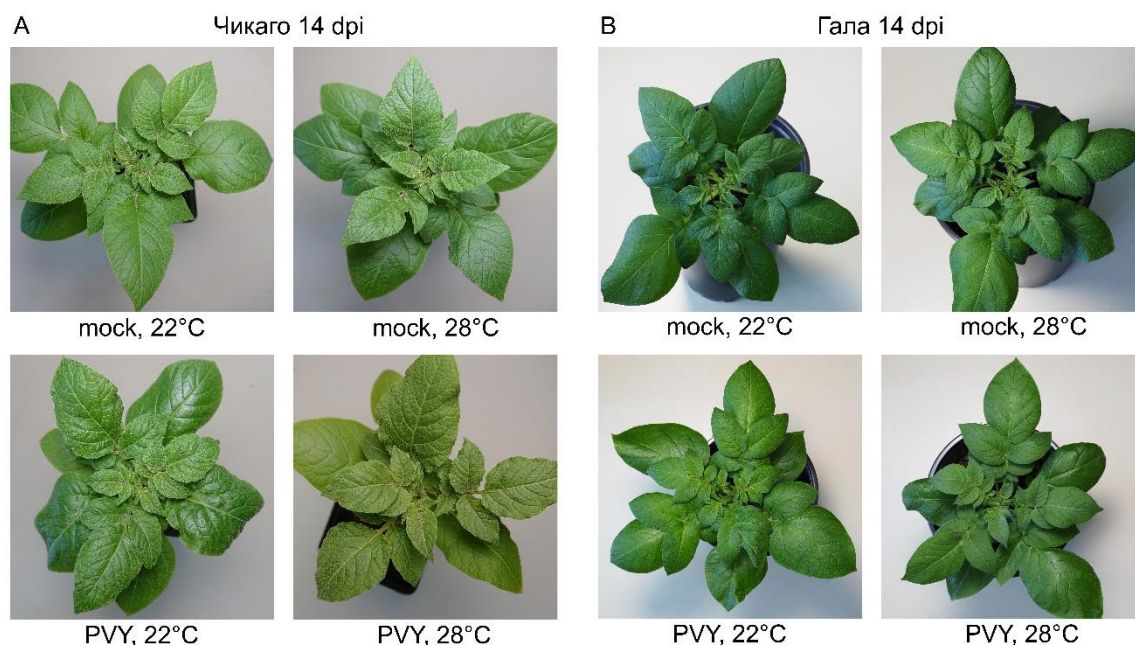


Рис. 1. Внешний вид здоровых (mock) и заражённых (PVY) растений контрастных сортов картофеля (А – Чикаго, В – Гала) на 14 dpi при нормальной (22°C) и повышенной (28°C) температурах.

Сорт Гала характеризуется заметной устойчивостью к инфекции PVY как при нормальной, так и при повышенной температуре, что показано в нашей ранней работе (Makarova *et al.*, 2018). Начиная с 8 дня после заражения, вирус можно детектировать в системных (неинокулированных) листьях на минимальном уровне (Рис.2В). Динамика накопления вирусной РНК (определённая с помощью ПЦР-РВ) при нормальной температуре практически не изменялась на протяжении трёх недель, при повышенной температуре наблюдалось незначительное (менее чем в 2 раза) увеличение содержания РНК в новых листьях (Рис.2В). Это свидетельствует о том, что сорт Гала обладает высокой толерантностью к инфекции, при этом вирус, несмотря на его способность системно заражать растения, не вызывал никаких ярких симптомов (Рис.1В), но сохранял способность реплицироваться на низком уровне и в инокулированных, и в системно заражённых листьях (Makarova *et al.*, 2018).

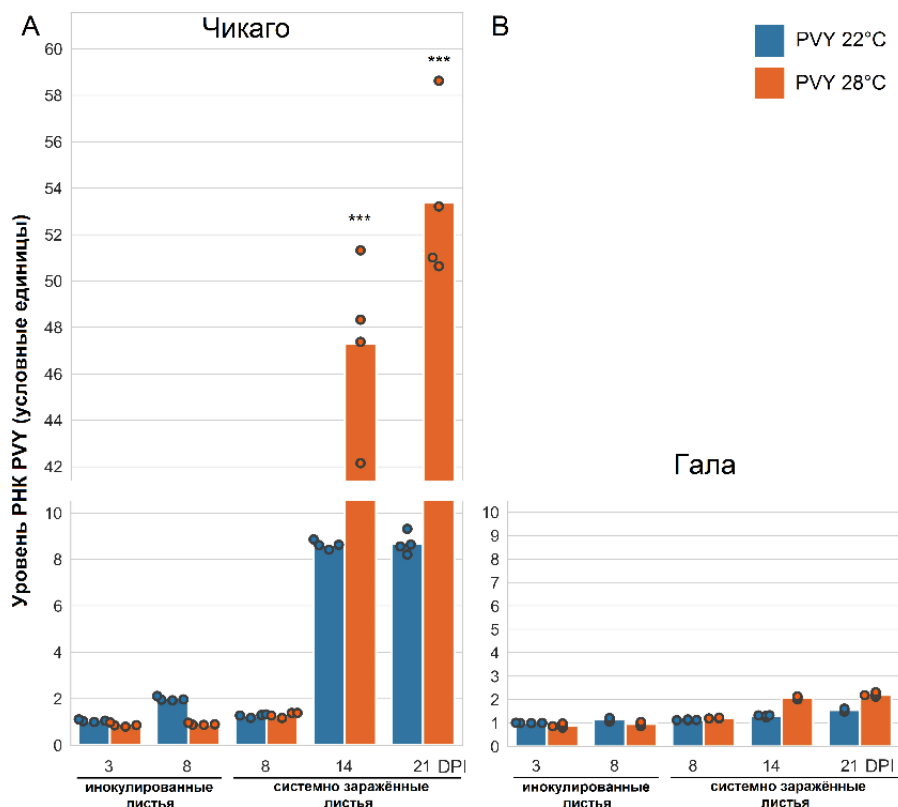


Рис. 2. Уровни накопления РНК PVY в заражённых и системных листьях растений картофеля (А – Чикаго, В – Гала) на 3, 8, 14 и 21 dpi при 22°C и 28°C.

Таким образом, у контрастных сортов реакция на вирус проявлялась по-разному, а повышенная до 28°C температура оказывала влияние на увеличение восприимчивости к инфекции PVY.

2. Протеомное профилирование инфицированных Y вирусом картофеля растений картофеля на фоне нормальной и повышенной температуры

Для изучения реакции протеома контрастных сортов картофеля на заражение PVY при повышенной и нормальной температуре проведён количественный протеомный анализ с использованием изобарных меток для относительного и абсолютного количественного анализа (iTRAQ). Опытные растения картофеля инокулировали экстрактом Y вируса картофеля, контрольные растения обрабатывали буфером (mock-инокуляция). Для имитации теплового стресса половину растений переносили с 22°C (вариант с нормальной температурой) на 28°C (вариант с комплексным стрессом) через 2 дня после заражения. Анализировали протеомные ответы на умеренно ранних (8 dpi) и поздних (14 dpi) сроках.

Для восприимчивого сорта Чикаго всего идентифицировано 19376 пептидов с коэффициентом ложноположительных результатов (FDR) 1%, которые относились к 5057 белкам по базе данных Phytozome V12 *Solanum tuberosum* (в сочетании с хлоропластными и митохондриальными белками). Для устойчивого сорта Гала идентифицировано 5939 белков, которым соответствует 22741 пептид. Количество пептидов и соответствующих им белков, идентифицированных с помощью метода жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS) для образцов растений, заражённых вирусом при нормальной и повышенной температурах, указано в таблице 1.

Таблица 1. Количество пептидов и белков, идентифицированных с помощью LC-MS/MS.

	PVY 22°C, 8dpi	PVY 28°C, 8dpi	PVY 22°C, 14dpi	PVY 28°C, 14dpi
Чикаго – пептиды	11 038	12 923	12 409	12 876
Чикаго – белки	3 029	3 244	3 613	3 493
Гала – пептиды	11 636	14 415	13 074	13 951
Гала – белки	3 135	3 666	3 664	3 364

Дифференциально экспрессирующиеся белки (ДЭБ) определяли соотношением изменения экспрессии в опытных и контрольных образцах, которое отражает изменение представленности данного белка (fold change).

2.1 Изменения протеома сорта Чикаго в ответ на вирусную инфекцию при нормальной температуре (22°C)

На 8 dpi в инфицированных растениях сорта Чикаго идентифицировано 16 ДЭБ, включая 5 с растущей и 11 с пониженной представленностью. Среди растущих ДЭБ обнаружены белки, вовлечённые в ответ на абиотический стресс, например такие как супероксид дисмутаза, которая играет важную роль в защите растений от повреждений, вызываемых действием активных форм кислорода (АФК) (Younus *et al.*, 2018); или фибриллин 8, липид-связывающий белок ассоциированный с пластидами, индуцируемый абсцизовой кислотой (Yang *et al.*, 2006). Снижающиеся ДЭБ включали рибосомальные белки, глутамин-циклотрансферазу, монодегидроаскорбат редуктазу. Известно, что последние два белка в растениях участвуют в нейтрализации последствий повреждений, вызываемых абиотическим стрессом (Johnston *et al.*, 2015; Paulose *et al.*, 2013).

К 14 dpi вирусная инфекция приводила к изменению представленности 23 белков. Среди растущих 18 ДЭБ можно отметить группу рибосомальных белков, а также α -тубулин, который входит в состав цитоскелета. Это согласуется с другими исследованиями, где говорится о вовлечении цитоскелетных компонентов во внутри- и внеклеточный транспорт многих вирусов (Pitzalis *et al.*, 2018). Среди снижающихся 5 белков идентифицированы хлоропластные белки и супероксид дисмутаза. Примечательно, что представленность последней была увеличена на ранних сроках. Это может свидетельствовать о том, что в растении на этой стадии заражения происходит снижение защиты от повреждений, вызываемых АФК (Younus *et al.*, 2018).

Небольшое количество меняющихся белков позволяет сделать вывод об относительно умеренной реакции растений сорта Чикаго на PVY при нормальной температуре.

2.2 Изменения протеома сорта Чикаго в ответ на вирусную инфекцию при повышенной температуре (28°C)

На 8 день в условиях комплексного стресса идентифицировано 64 ДЭБ, представленность 15 из которых повышалась, и, соответственно, 49 понижалась. Среди растущих ДЭБ можно отметить белки связанные с ответом на стресс, такие как кальретикулин, белок солеустойчивости, кислая эндохитиназа и пататин 3. Учитывая многообразие ДЭБ, представленность которых снижалась, для их характеристики использовались дополнительные инструменты, такие как g:Profiler (Raudvere *et al.*, 2019) для анализа обогащения по функциональной принадлежности (GO term). Согласно этому анализу, растущие белки связаны

с такими биологическими процессами, как трансляция (GO: 0006412), метаболический клеточный амидный процесс (GO: 0043603), биосинтетический амидный процесс (GO: 0043604) и другие. Для построения сетей белок-белковых взаимодействий использовалась база данных STRING (Szklarczyk *et al.*, 2021). Среди снижающихся ДЭБ особо выделялись два кластера – рибосомальные белки и белки метионинового цикла (Рис.3).

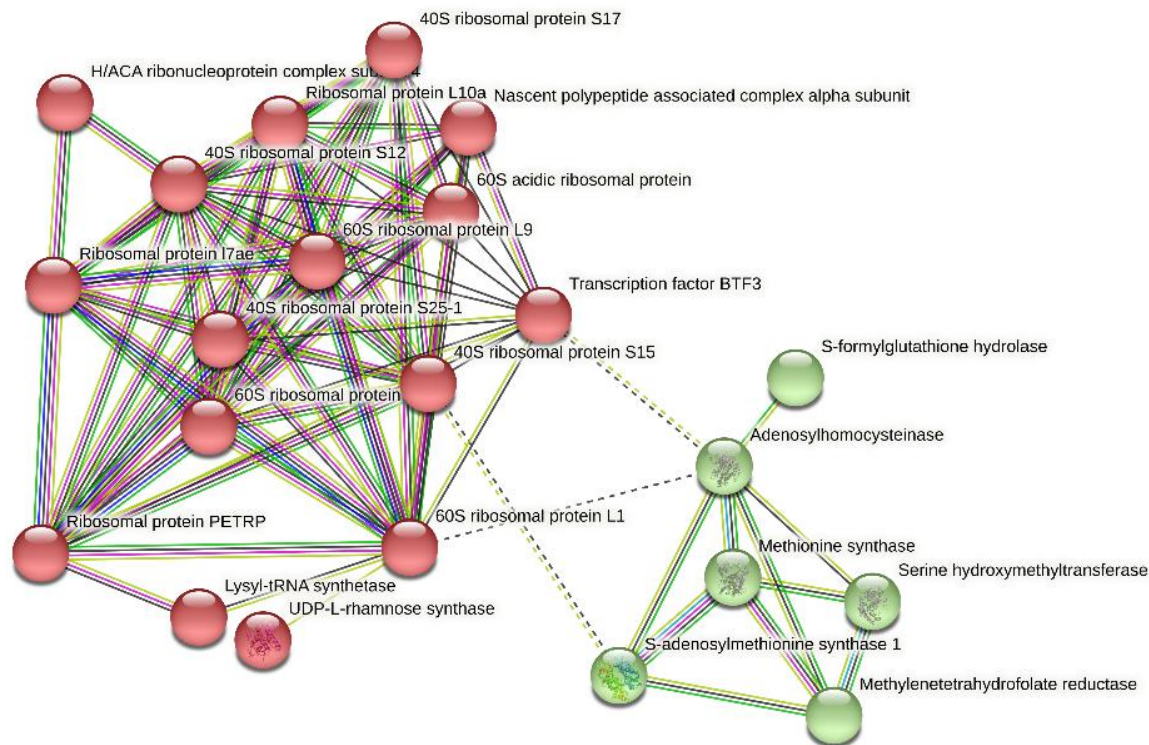


Рис.3. Функциональные сети белок-белковых взаимодействий снижающихся в ответ на комплексный стресс белков у сорта Чикаго на 8 dpi, построенные с использованием базы данных STRING. Красным цветом окрашены рибосомальные белки, зелёным – белки МЦ.

Метиониновым циклом (МЦ) называется совокупность реакций, в которых образуется, потребляется и регенерируется S-аденозил-метионин / SAM (Рис.4). SAM является классическим донором метильной группы, перенос которой на различные субстраты является основой процесса метилирования. Растения также используют SAM в качестве предшественника для синтеза этилена, полиаминов и биотина (Moffatt *et al.*, 2001).

Снижающие свою представленность метионин синтаза (MS), S-аденозилметионин синтаза (SAMS) и аденозил-гомоцистеиназа (SAHH), являются основными ферментами МЦ, а серин гидроксиметилтрансфераза (SHM) и метилентетрагидрофолат редуктаза (MTHFR) относятся к ферментам фолатного подцикла МЦ (Рис.4). Известно, что МЦ может играть важную роль в защите растений от вирусной инфекции (Mäkinen *et al.*, 2019; Ivanov *et al.*, 2016), и снижение представленности его ферментов, предположительно, приводит к нарушениям нормального функционирования МЦ, что в свою очередь может предшествовать усилению восприимчивости к PVY при повышенной температуре.

Что касается снижения представленности группы рибосомальных белков, то это может свидетельствовать о том, что вирусная инфекция при повышенной температуре негативно воздействует на трансляционные процессы в растении.

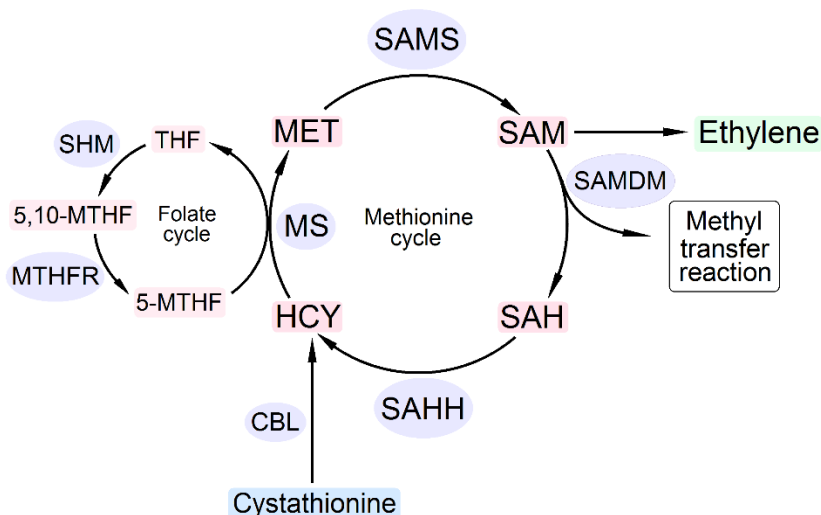


Рис.4. Схематическое изображение метионинового цикла и фолатного подцикла. Направление потока метаболитов (розовый цвет) показано стрелками, ферменты, участвующие в их превращении отмечены фиолетовым цветом.

На 14 dpi в условиях комбинированного стресса идентифицировано 79 ДЭБ с растущей экспрессией, из которых можно отметить защитные белки, такие как β -глюканаза, патогенный и индуцируемый поранением противогрибковый белок, кислая эндохитиназа и хитиназа II класса. Известно, что хитиназы играют важную роль в защите от таких вредителей, как грибы и насекомые, но протеомные исследования показали, что их экспрессия меняется также и в ответ на вирусную инфекцию. Также показано, что представленность β -глюканызы часто возрастает в ответ на вирусную инфекцию у некоторых культур, предполагается, что роль этого белка в защите от патогенов заключается в отложении каллозы и регуляции симплазматической проницаемости у растений (Levy *et al.*, 2021). Анализ обогащения по функциональной принадлежности показал обогащение по следующим биологическим процессам: реакции на стресс (GO:0006950), сборка белка (GO:0006457) и ответ на окислительный стресс (GO:0006979). Также при этих условиях идентифицировано 73 ДЭБ с пониженной представленностью. Более всего снижалась экспрессия группы хлоропластных белков; помимо этого обнаружены некоторые связанные с МЦ белки: 2 белка S-аденозилметионин синтазы и S-аденозил-L-метионин Mg-протопорфирин IX метил-трансфераза. Согласно GO term анализу, снижающиеся белки связаны с фотосинтезом (GO:0015979), биосинтезом тетрапиррола (GO:0033014) и световой фазой фотосинтеза (GO:0009765).

Можно сделать вывод о том, что протеом растений сорта Чикаго, восприимчивого как к вирусному заражению, так и тепловому стрессу, в целом слабо реагировал на стрессовые факторы, однако к 14 дню после заражения количество меняющихся относительно контроля белков возросло при воздействии комплексного стресса.

2.3 Изменения протеома сорта Гала в ответ на вирусную инфекцию при нормальной температуре (22°C)

В отличие от сорта Чикаго, ответ сорта Гала на вирусную инфекцию при нормальной температуре оказался намного интенсивнее. На 8 dpi идентифицировано 43 ДЭБ, большинство из которых (32) подавлялись; среди них выявлены несколько рибосомальных белков, глутатион S-трансфераза/пероксидаза, индуцируемый поранением белок WIN1, профилин. Про последний

известно, что это актин-связывающий белок, который ингибирует полимеризацию актина и способствует элонгации F-актина (Sun *et al.*, 2013). Из 11 растущих в ответ на вирусную инфекцию белков большинство относится к хлоропластным белкам: белок фотосистемы I P700 апопротеин A1, белки фотосистем II D1 и D2, хлорофилл a-b связывающий белок 6A и другие. Известно, что гены, кодирующие белки фотосинтеза восприимчивы к биотическому стрессу. Обычно наблюдается снижение экспрессии этих белков, однако есть исследования, в которых показано повышение экспрессии хлоропластных белков. Так вирусные белки могут взаимодействовать с рубиско, повышенная экспрессия которого способствует отсутствию симптомов у картофеля (Stare *et al.*, 2015). Кроме того, следует отметить повышение представленности S-аденозилметионин зависимой метилтрансферазы (SAMDM), одного из ферментов МЦ.

На 14 dpi изменения протеома оказались ещё более выражены: всего идентифицировано 189 ДЭБ в заражённых вирусом растениях сорта Гала на фоне нормальной температуры. Среди растущих 106 белков можно отметить такие белки, как фактор инициации трансляции 5A-4, глутатион S-трансфераза/пероксидаза, метакаспаза 1 и другие. Метакаспазы относятся к цистеиновым пептидазам и в растениях принимают участие в программируемой клеточной смерти (Bozhkov *et al.*, 2005). Примечательно, что глутатион S-трансфераза/пероксидаза, представленность которой на 8 день снижалась, на 14 dpi была обнаружена среди растущих ДЭБ. Это один из значимых антиоксидантных ферментов, который может играть важную роль в снижении накопления токсичных соединений в растении (Islam *et al.*, 2017). Стоит отметить рост представленности ферментов МЦ: метионин синтазы, S-аденозилметионин синтазы и серин гидроксиметилтрансферазы. GO анализ показал, что растущие белки участвуют в метаболизме малых молекул (GO:0044281), карбоновых кислот (GO:0019752), оксокислот (GO:0043436), органических кислот (GO:0006082) и других процессах.

Среди 83 белков с пониженной экспрессией выделяется группа рибосомальных белков, также как у восприимчивого сорта. Различные рибосомальные белки взаимодействуют с вирусной мРНК и вирусными белками. Большинство взаимодействий необходимы для вирусной трансляции и репликации, но есть сведения об участии рибосомальных белков в защитных противовирусных путях у растений (Li *et al.*, 2019). Также снижается представленность нескольких фотосинтетических белков и супероксид дисмутаз. Анализ обогащения по функциональной принадлежности снижающихся белков показал, что большинство процессов связано с защитой от окислительного стресса (GO:0071451, GO:0019430, GO:0034614, GO:0000303, GO:0000305).

2.4 Изменения протеома сорта Гала в ответ на вирусную инфекцию при повышенной температуре (28°C)

В условиях комплексного стресса протеомный ответ оказался более многочисленным. На 8 dpi идентифицировано 120 ДЭБ с растущей и 171 ДЭБ с пониженной представленностью. Среди растущих белков встречается несколько представителей семейства HSP – белков теплового шока (Рис.5). Это хорошо согласуется с предыдущим исследованием, где показано,

что при данных условиях экспрессия HSP растёт также и на уровне транскриптома, и достигает своего пика на 8 день (Макарова *et al.*, 2018). Как и при нормальной температуре, наблюдается рост некоторых хлоропластных белков (Рис.5), например, белки фотосистемы II и группа белков рубиско. Показано, что белок оболочки PVY взаимодействует с большой субъединицей рубиско, что может являться причиной возникновения симптомов хлороза и мозаики (Feki *et al.*, 2005). Ещё один примечательный растущий белок это цистатионин β-лиаза (CBL), который является вторым ферментом, катализирующим синтез гомоцистеина – предшественника метионина в реакциях МЦ (Рис 4, 5). Согласно GO term анализу, среди растущих на 8 день ДЭБ обнаружены группы белков, связанные с ответами на перекись водорода (GO:0042542), а также на тепловой (GO:0009408) и окислительный (GO:0000302) стрессы.

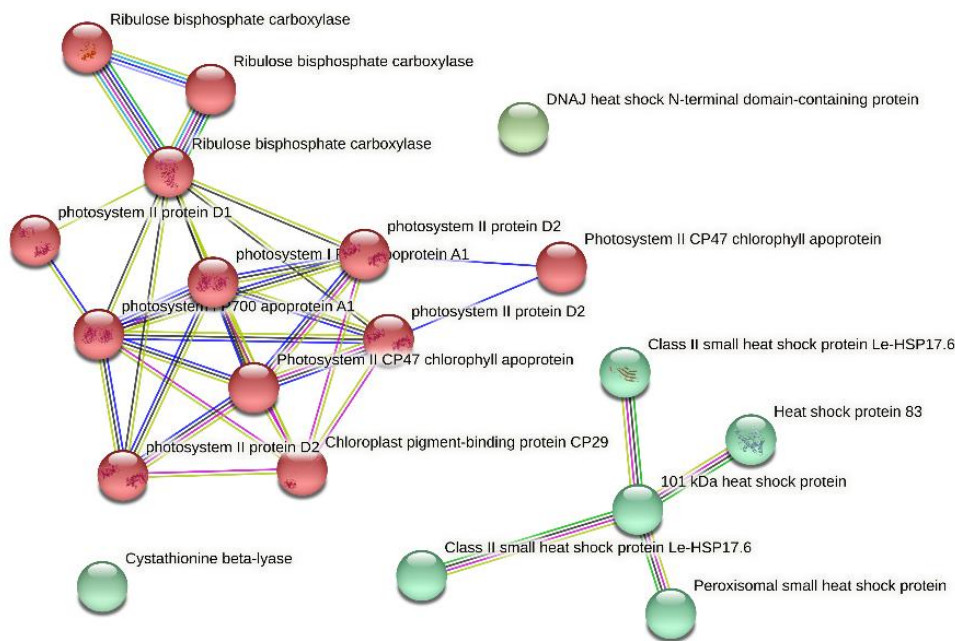


Рис. 5. STRING сети взаимодействия растущих в ответ на комплексный стресс белков у сорта Гала на 8 дни. Красным цветом окрашены хлоропластные белки, зелёным – HSP.

Среди белков с пониженной представленностью можно отметить наиболее снижающиеся супероксид дисмутазу, белок SGRP-1, фактор инициации трансляции eIF1, гермин. Известно, что последний играет важную роль в ответах на различные стрессы у растений (Пуас *et al.*, 2016). Также как и при нормальной температуре отмечено снижение группы рибосомальных белков (Рис.6). Интересно, что представленность метионин синтазы, которая возростала на 14 день в результате вирусного воздействия, снижалась в ответ на комплексное воздействие на 8 день. В результате анализа STRING сетей взаимодействия, выделяется целый кластер гистонов (H2A, H2A.1, H3.2, H2B, H3.3, рис.6). В обзоре Ramirez-Prado сообщается о важности ремоделирования хроматина в регуляции ответа растения на патогены: различные модификации гистонов влияют на экспрессию защитных генов, что может приводить к индукции иммунного ответа растений (Ramirez-Prado *et al.*, 2018). GO-анализ белков, представленность которых снижалась, показал обогащение по таким биологическим процессам, как трансляция (GO:0006412), биосинтез пептидов (GO:0043043), биосинтетический амидный процесс (GO:0043604), и др.

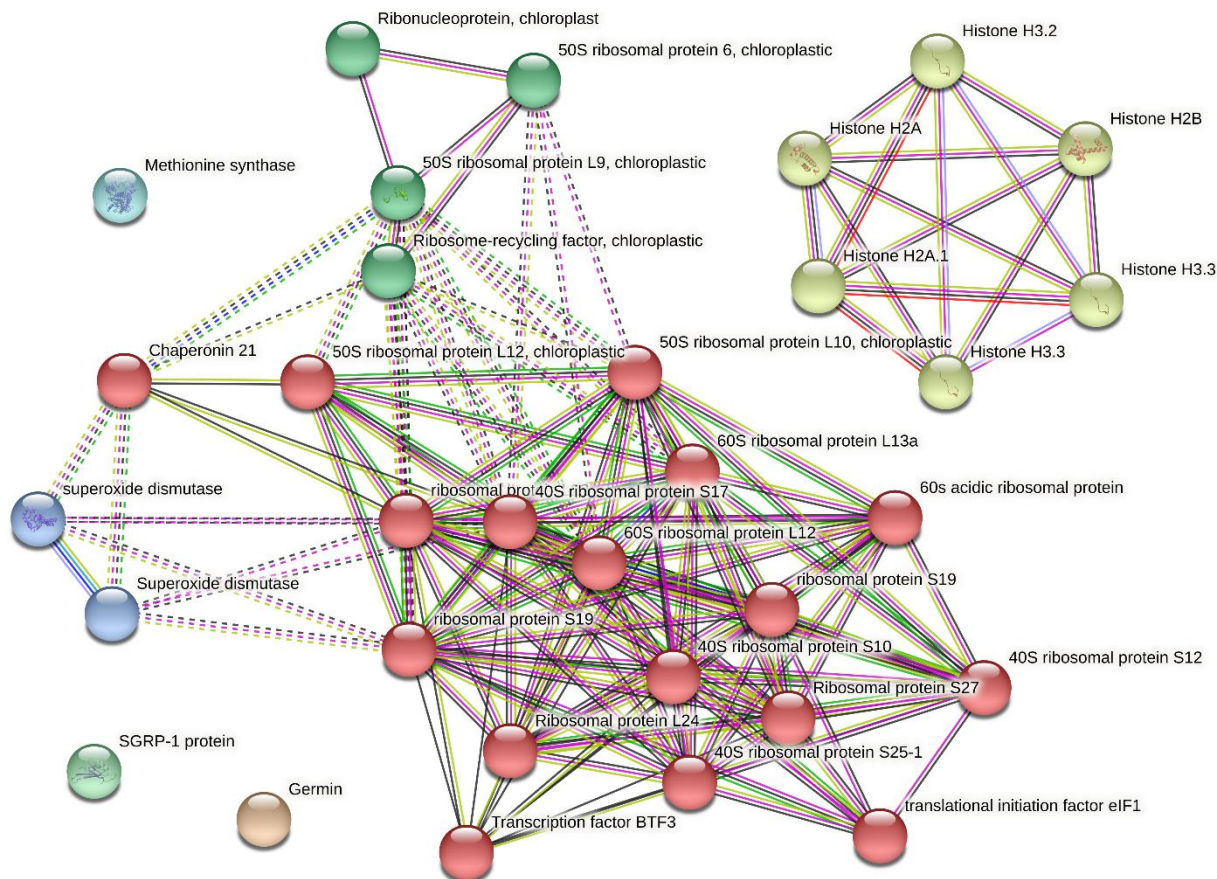


Рис. 6. STRING сети взаимодействия снижающихся в ответ на комплексный стресс белков у сорта Гала на 8 dpi. Красным цветом окрашены рибосомальные белки, жёлтым – гистоны.

Наиболее обширный протеомный ответ устойчивого сорта в ответ на комплексный стресс отмечен на 14 dpi, где идентифицировано 399 ДЭБ, включая 150 с растущей и 249 с пониженной представленностью. Как и на раннем сроке, наибольший рост показала группа белков семейства HSP. В 3 раза росла представленность большой субъединицы рубиско. Также среди растущих белков можно отметить ингибитор трипсина Kunitz, аргинил-тРНК синтетазу, глутатион S-трансферазу, липоксигеназу, аннексин 11. Последний относится к семейству кальций-зависимых фосфолипид-связывающих белков, которые индуцируются в ответ на различные абиотические стрессы (Saad *et al.*, 2020). Представленность некоторых белков, например таких как серин гидроксиметилтрансфераза или глутатион S-трансфераза/пероксидаза, повышались как на фоне нормальной, так и повышенной температуры в результате воздействия вирусной инфекции. GO-анализ показал аналогичное с ответом на вирусную инфекцию при нормальной температуре обогащение по процессам: метаболизм малых молекул, карбоновых кислот, оксокислот и органических кислот.

Среди снижающихся белков, как и на раннем сроке, выявлены группа рибосомальных белков, супероксид дисмутаза и белок SGRP-1. Кроме них снижалась экспрессия транскрипционного фактора BTF3, глутамин циклотрансферазы, церамидазы и др. Также отмечено снижение некоторых белков, связанных с патогенезом, например MJ-индуцируемый PR-белок – NtPRp27 и PR10. Снижающиеся ДЭБ связаны с такими биологическими процессами, как фотосинтез (GO:0015979) и световая фаза фотосинтеза (GO:0019684, GO:0009768, GO:0009765), а также трансляция (GO:0006412) и процесс биосинтеза пептидов (GO:0043043).

3. Роль ферментов метионинового цикла в формировании ответа растений на инфекцию, вызываемую Y вирусом картофеля

Одним из наиболее интересных открытий, полученных в результате проведения протеомного анализа, оказался феномен разнонаправленного изменения представленности основных ферментов МЦ у контрастных сортов картофеля в ответ на вирусную инфекцию в сочетании с тепловым стрессом. У восприимчивого сорта Чикаго обнаружено снижение экспрессии всех ключевых ферментов МЦ и связанного с ним фолатного подцикла в ответ на вирусную инфекцию при повышении температуры. Напротив, у устойчивого сорта Гала практически те же самые ферменты МЦ оказались среди растущих ДЭБ.

Для исследования того, какую роль играют протеомные изменения, связанные с МЦ, в формировании устойчивости/восприимчивости растений к вирусной инфекции и комплексному стрессу, был проведён более детальный анализ выявленных изменений на уровне транскриптома и метаболома.

3.1. Изменение представленности основных ферментов МЦ в результате воздействия вирусной инфекции на фоне нормальной и повышенной температуры

В результате протеомного анализа заражённых PVY растений сорта Чикаго обнаружено изменение экспрессии для нескольких белков, участвующих в метиониновом цикле и сопутствующих путях (Рис.7А). Наибольшие изменения отмечены на 8 день опыта – там снижалась представленность целой группы ферментов: MS, SAMS, SAHH, SHM и MTHFR, но только после воздействия

повышенной температуры на заражённые растения. Однако, представленность одного из ферментов – SAHH, на более позднем сроке (14 dpi), немного возросла на фоне нормальной температуры. Также на 14 день отмечено снижение двух видов SAMS в ответ на воздействие комплексного стресса (Рис.7В). В целом, можно отметить взаимосвязь между снижением представленности ключевых ферментов МЦ и повышенной восприимчивостью растений картофеля сорта Чикаго к вирусной инфекции в условиях теплового стресса.

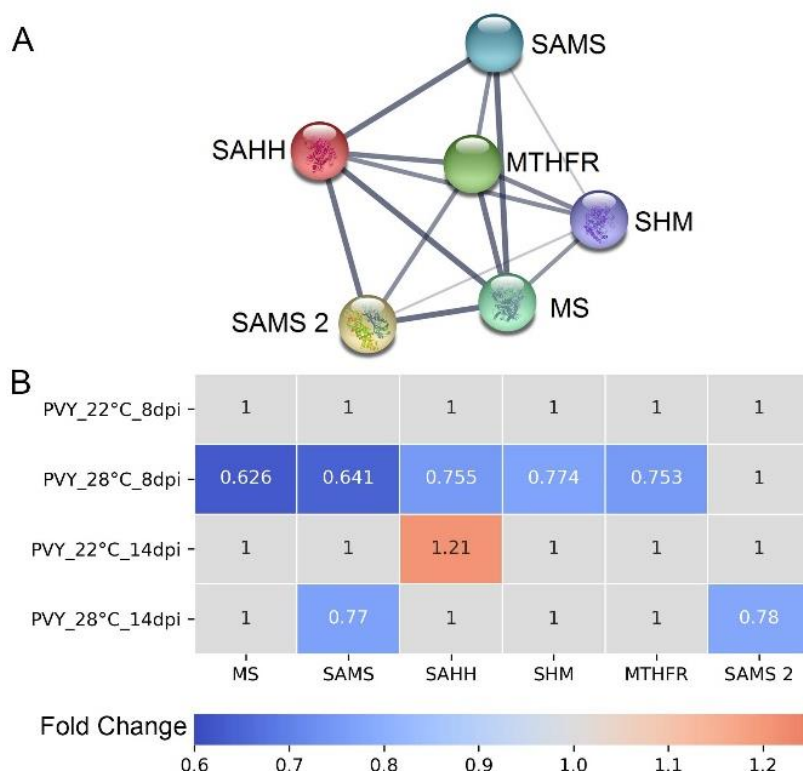


Рис. 7. (А) *STRING* сети функциональных связей дифференциально экспрессируемых белков, связанных с МЦ в инфицированных растениях сорта Чикаго. (В) *Тепловая карта*, отображающая изменения в представленности основных ферментов МЦ в ответ на заражение PVY при 22°C и 28°C, на 8 и 14 dpi

Примечательно, что при изучении протеома устойчивого сорта Гала также обнаружено изменение экспрессии некоторых ферментов МЦ (Рис.8А). Так, на раннем сроке (8 день) в ответ на вирусную инфекцию индуцировалась экспрессия SAMDM, одной из метилтрансфераз, чья функция заключается в переносе метильной группы на молекулу субстрата в трансметилазных реакциях. При воздействии комплексного стресса росла представленность CBL – фермента, катализирующего реакцию синтеза гомоцистеина из цистатионина (Рис.4). Для MS отмечено небольшое снижение на 8 день в ответ на комплексный стресс, однако на 14 день её представленность возрастала при вирусной инфекции (Рис.8В). MS отвечают за преобразование гомоцистеина в метионин, и играют важную роль в нормальном функционировании МЦ. Кроме MS, в ответ на вирусную инфекцию на 14 день повышалась представленность SAMS. Представленность фермента SHM была повышена как при воздействии вирусной инфекции, так и при комбинированном стрессе на 14 день (Рис.8В). Таким образом, в отличие от согласованного снижения представленности ферментов МЦ у сорта Чикаго, представленность этих ферментов у сорта Гала выражалась по-разному при разных температурах и на разных стадиях инфекции, но преимущественно росла

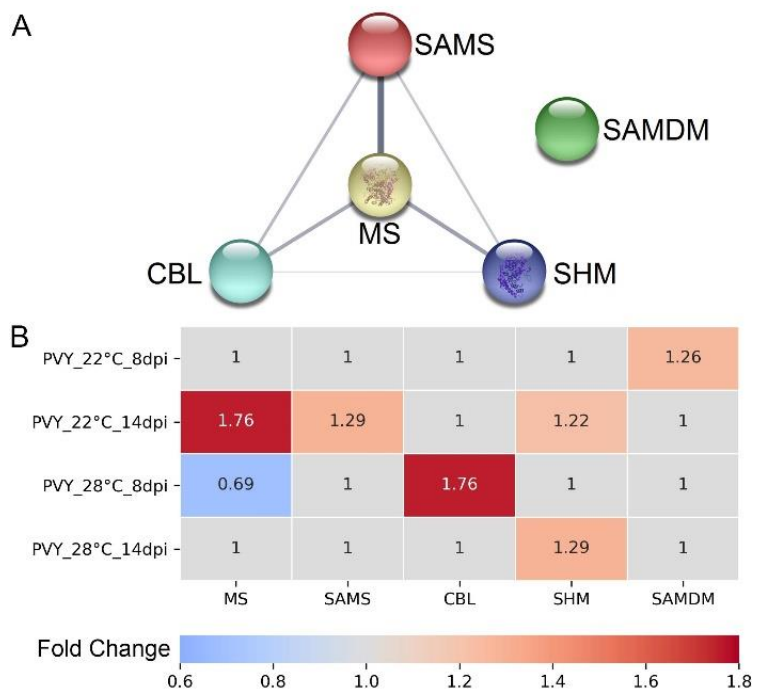


Рис. 8. (А) STRING сети функциональных связей дифференциально экспрессируемых белков, связанных с МЦ в инфицированных растениях сорта Гала. (В) Тепловая карта, отображающая изменения в представленности основных ферментов МЦ в ответ на заражение PVY при 22°C и 28°C, на 8 и 14 dpi

3.2. Изменение уровней экспрессии РНК ключевых генов МЦ в результате воздействия вирусной инфекции на фоне нормальной и повышенной температуры

На следующем этапе проанализировали влияние инфекции PVY на экспрессию генов МЦ. Для сорта Чикаго проверили уровни транскрипции генов ферментов МЦ MS, SAMS, и SAHH, а также генов ферментов фолатного подцикла SHM и MTHFR. Так как основные протеомные изменения выявляли на 8 день, для анализа генов выбрали более ранние точки: 3, 5 и 8 день, поскольку известно, что изменения на уровне транскриптома предшествуют изменениям протеома и проявляются несколько ранее. Анализ ПЦР-РВ показал, что системная инфекция PVY при повышенной температуре значительно, но временно снижает транскрипцию генов MS, SAMS, SAHH, SHM, и MTHFR на сроках с 5 по 8 dpi (Рис.9). Кроме того, эти транскрипционные изменения предшествовали росту накопления вирусной РНК на фоне повышенной температуры, что, предположительно, совпадает с началом снижения представленности ферментов на 8 день. Напротив, при нормальной температуре, вирусная инфекция не оказывала

влияния на транскрипцию генов *SAMS*, *SAHH*, *SHM*, и *MTHFR*, хотя накопление транскрипта *MS* на 5 день умеренно возрастало. Интересно, что повышенная температура не оказала влияния на экспрессию генов ферментов МЦ у контрольных растений по сравнению с нормальной температурой. В совокупности эти данные предполагают, что снижение экспрессии генов основных ферментов МЦ в ответ на комплексный стресс, влечёт за собой последовательное снижение уровня накопления ключевых метаболитов МЦ, что может приводить к нарушению широкого спектра процессов трансметилирования. Это, в свою очередь, может повлиять на восприимчивость растений картофеля к PVY в условиях температурного стресса

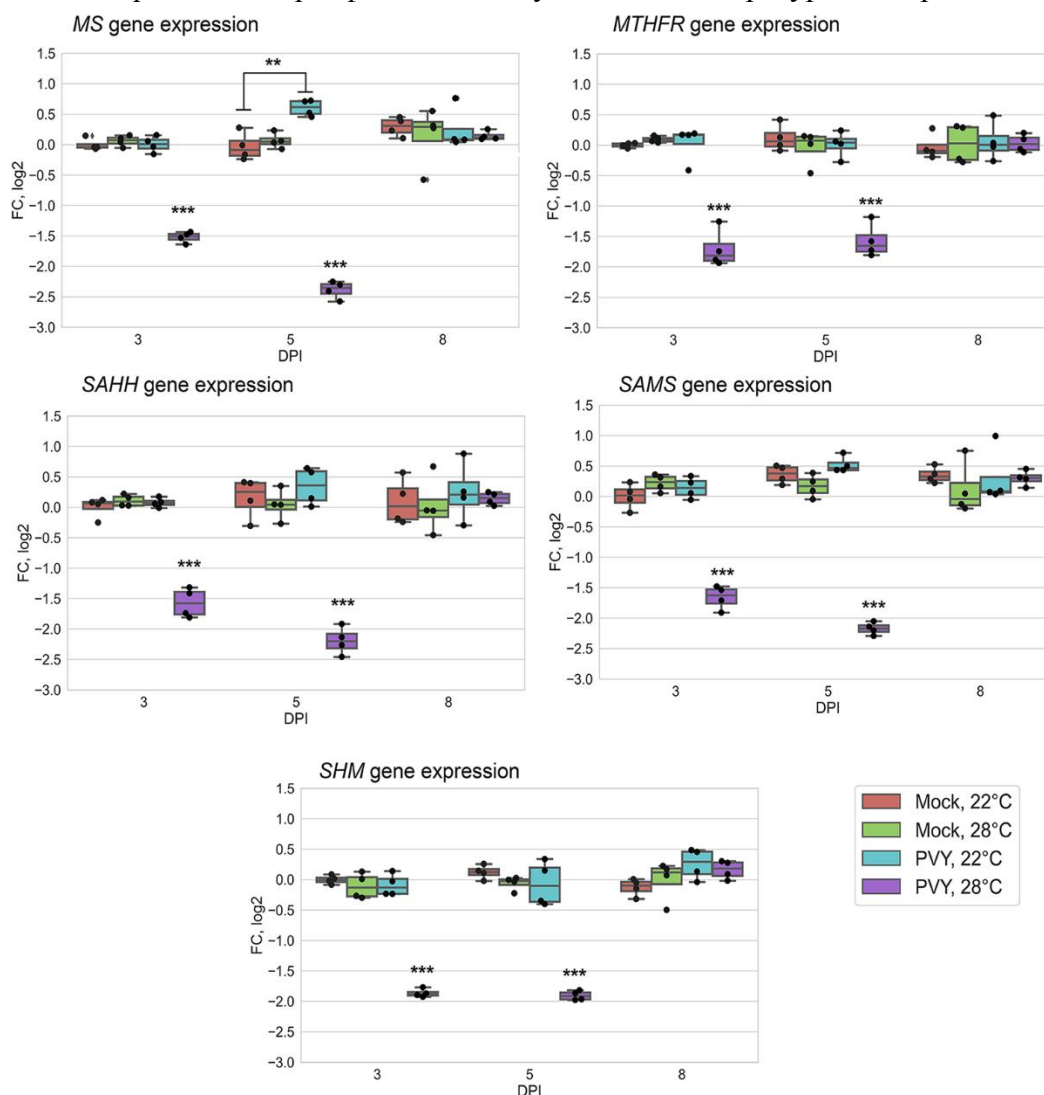


Рис. 9. Уровни экспрессии генов ферментов МЦ в инфицированных листьях растений картофеля сорта Чикаго при 22°C и 28°C, на 3, 5 и 8 дни после заражения PVY/тоск-инокуляции

При изучении транскриптома сорта Гала исследовали экспрессию генов *MS*, *SAMS*, *SAHH*, *CBL*, *SHM* и *SAMDM*, в соответствии с результатами протеомного анализа. Помимо 8 и 14 дня проверили 5 день опыта, чтобы уловить ранние изменения транскриптома. Анализ ПЦР-РВ показал, что вирусная инфекция вызвала изменения экспрессии для генов *MS*, *SAMS*, *CBL* и *SHM*, но не *SAHH* (Рис.10). Более того, эти изменения хорошо коррелировали со скоростью накопления белка, определенной в результате протеомного анализа, и сильно зависели от температурных условий и стадии заражения. В частности, вирусная инфекция при нормальной температуре вызывала стойкое повышение уровней транскриптов *MS* и *SAMS* от 8 dpi до

конечной экспериментальной точки (14 dpi), а также *SHM* на всех исследуемых сроках. Эти транскрипционные изменения совпали с повышенным накоплением ферментов MS, SAMS и SHM, что особенно заметно на 14 dpi (Рис.8B, 10). При повышенной температуре наблюдалось увеличение уровня экспрессии генов *CBL* и *SHM* на раннем (с 5 по 8 dpi) сроке и только *SHM* на поздней (14 dpi) стадии инфекции PVY (Рис.10). Эти транскрипционные изменения также коррелировали с увеличением представленности ферментов *CBL* и *SHM* (Рис.8B). Между тем, экспрессия гена *MS* при этих условиях падала на 5 день, что приводило к снижению представленности фермента MS на 8 dpi. Так же, как и в случае с результатами анализа сорта Чикаго, повышенная температура не оказала влияния на экспрессию какого-либо из этих генов в mock-инокулированных растениях по сравнению с нормальной температурой.

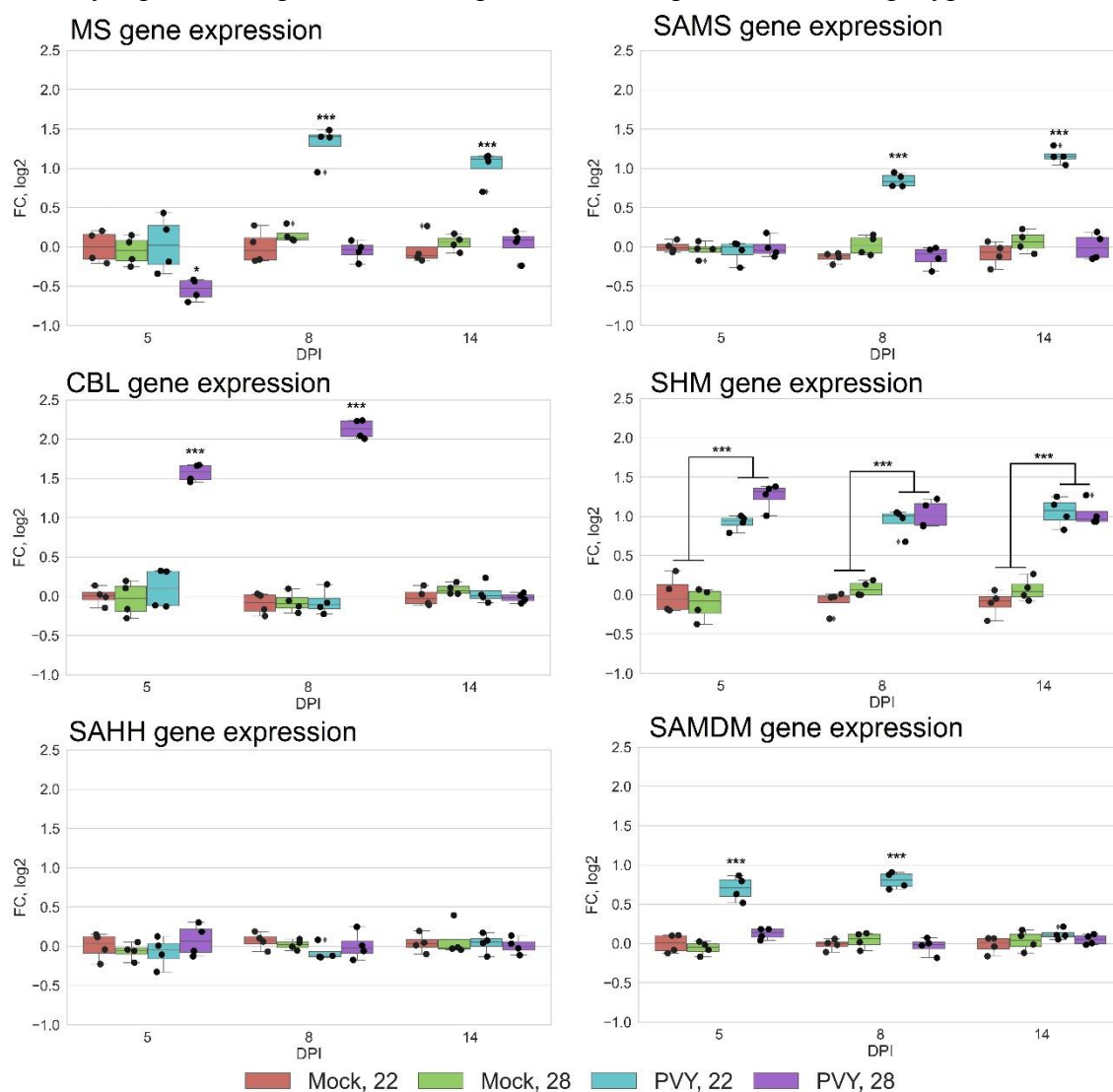


Рис. 10. Уровни экспрессии генов ферментов МЦ в инфицированных листьях растений картофеля сорта Гала при 22°C и 28°C на 3, 5 и 8 дни после заражения PVY/мock-инокуляции

В совокупности эти данные говорят о том, что в отличие от растений сорта Чикаго, у которого все ключевые ферменты МЦ согласованно подавлялись в результате воздействия инфекции PVY при высокой температуре, у сорта Гала различные ферменты МЦ экспрессировались по-разному в зависимости от температурных условий и стадии заражения, но при этом независимо друг от друга.

3.3. Изменение концентрации основных метаболитов МЦ в результате воздействия вирусной инфекции на фоне нормальной и повышенной температуры

Далее исследовали влияние изучаемых стрессов на накопление ключевых метаболитов МЦ для дальнейшего выяснения возможных связей между активностью метилирования и устойчивостью к вирусу. Изменения в концентрациях метаболитов или их соотношениях могут затрагивать широкий спектр реакций трансметилирования и оказывать влияние на исход вирусной инфекции.

В заражённых растениях сорта Чикаго снижение уровня транскрипции гена MS и генов, контролирующих фолатный подцикл (MTHFR, SHM), при повышенной температуре может приводить к ингибированию синтеза метионина (MET). Это предположение подтверждалось в результате измерения уровня содержания метионина. В результате воздействия комплексного стресса наблюдалось трёхкратное снижение концентрации метионина на всех измеряемых временных точках (Рис.11А). При этом воздействие одной вирусной инфекции не приводило к изменениям в накоплении MET. Для сорта Гала отмечалось увеличение содержания MET в заражённых растениях, чему могла способствовать повышенная экспрессия генов MS и SHM. При этом на фоне повышенной температуры наблюдалось более интенсивное накопление, что свидетельствует об активации синтеза метионина в этих условиях (Рис.11В).

Метионин является предшественником гомоцистеина (НСУ) в реакциях МЦ, в связи с чем предполагается последовательное изменение этого метаболита в результате воздействия комплексного стресса на растения картофеля. У сорта Чикаго наблюдалось снижение уровня гомоцистеина (Рис.11С), в то время как у сорта Гала отмечалось его увеличение (Рис.11D) в результате комбинированного воздействия. Вирусная инфекция на фоне нормальной температуры не приводила к изменениям в уровне накопления НСУ у обоих сортов.

S-аденозилметионин (SAM) является основным донором метильной группы, что делает его ключевым компонентом МЦ. Показано, что после воздействия комплексного стресса на растения сорта Чикаго, содержание SAM значительно снизилось (Рис.11Е). Такое снижение концентрации согласуется с пониженным уровнем экспрессии фермента SAMS (Рис.9). В свою очередь для устойчивого сорта Гала показано, что вирусная инфекция увеличивала содержание SAM, особенно сильно при повышенной температуре (Рис.11F).

Для **S-аденозил гомоцистеина (SAH)**, который известен как ингибитор метилирования, отмечено значительное увеличение содержания после воздействия вирусной инфекции в сочетании с повышенной температурой у сорта Чикаго (Рис.11G). У сорта Гала содержание SAH также увеличивалось в этих условиях, но на более поздних стадиях инфекции. При этом уровень накопления SAH был ниже, чем у сорта Чикаго почти в 2 раза (Рис.11H).

Для обоих сортов не обнаружено разницы в уровнях накопления всех измеренных метаболитов у здоровых растений на фоне нормальной и повышенной температуры, что говорит о том, что тепловой стресс вызывает изменения в метаболоме исследуемых растений только в сочетании с вирусной инфекцией.

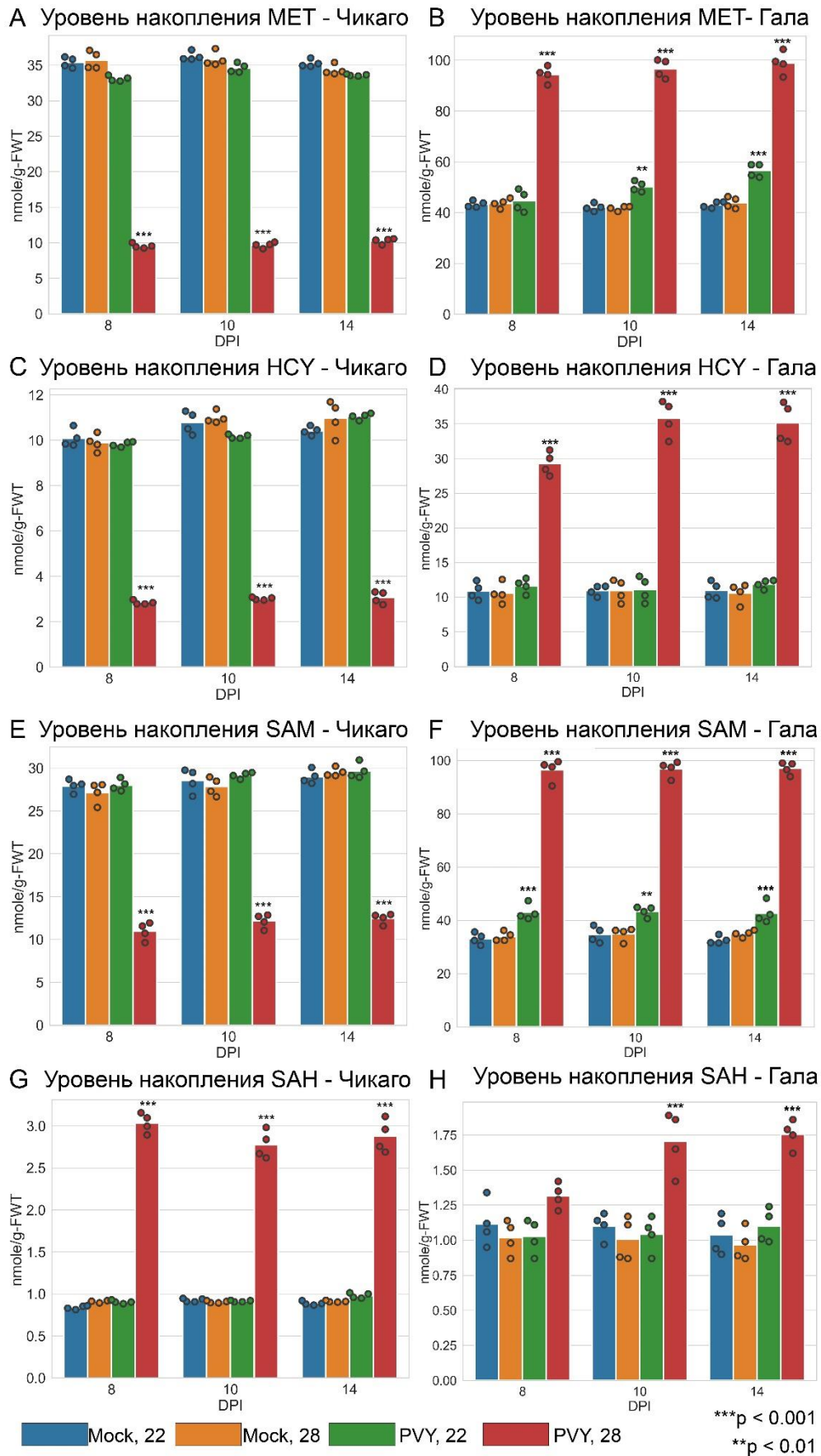


Рис. 11. Уровни накопления основных метаболитов МЦ в системно инфицированных листьях растений картофеля при 22°C и 28°C на 8,10 и 14 дни после заражения PVY/моск-инокуляции: содержание метионина (MET) у сорта Чикаго (А) и Гала (В); содержание гомоцистеина (НСУ) у сорта Чикаго (С) и Гала (D); содержание S-аденозилметионина (SAM) у сорта Чикаго (Е) и Гала (F); содержание S-аденозил гомоцистеина (SAH) у сорта Чикаго (G) и Гала (H).

3.4. Изменение индекса метилирования в результате воздействия вирусной инфекции на фоне повышенной температуры у контрастных сортов картофеля

Поскольку SAM является основным донором метильных групп в реакциях трансметилирования, а SAH является сильным ингибитором SAM-зависимых метилтрансфераз, соотношение содержания SAM к SAH обычно рассматривается как **индекс метилирования**, при этом уменьшение этого соотношения свидетельствует о снижении процессов метилирования в клетке (Moffatt *et al.*, 2001). Обнаруженное ранее резкое увеличение накопления вирусной РНК при повышенной температуре у заражённых PVY растений сорта Чикаго коррелировало со снижением концентрации SAM и увеличением концентрации SAH. В результате это приводило к уменьшению соотношения SAM:SAH (Рис.12А), что может указывать на то, что устойчивость к вирусу нарушается в связи со снижением активности метилирования. Полученные данные для устойчивого сорта Гала по протеомным и транскрипционным изменениям экспрессии ферментов МЦ в результате воздействия комплексного стресса кардинально отличались от таковых у восприимчивого сорта. Такие изменения приводили к увеличению всех исследуемых метаболитов МЦ, а особенно – SAM. При этом даже несмотря на то, что уровень SAH возрастал в результате комплексного стресса на поздних стадиях (Рис.11Н), соотношение SAM:SAH увеличивалось как при нормальной (на 8 dpi), так и при повышенной температурах (Рис.12В). Рост индекса метилирования у заражённых растений сорта Гала на фоне теплового стресса может свидетельствовать об усилении процессов метилирования, что вероятно определяет резистентность растений к вирусной инфекции.

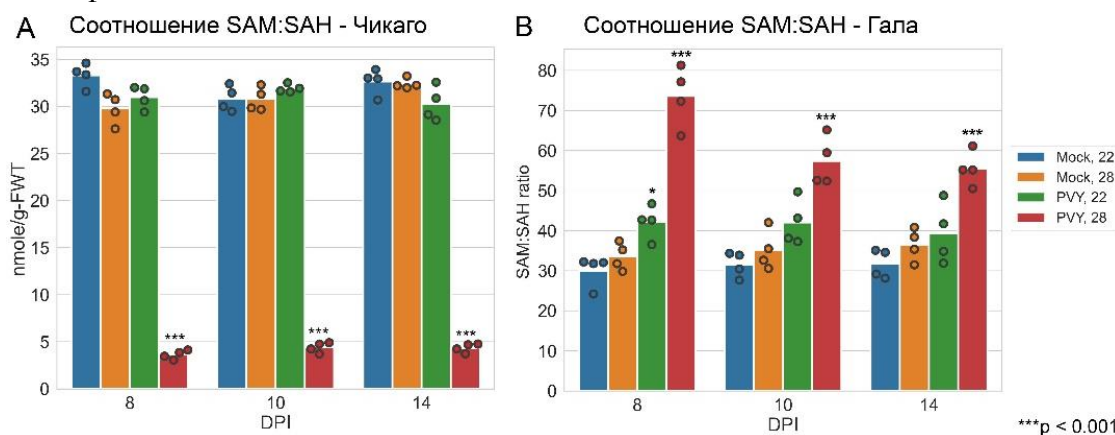
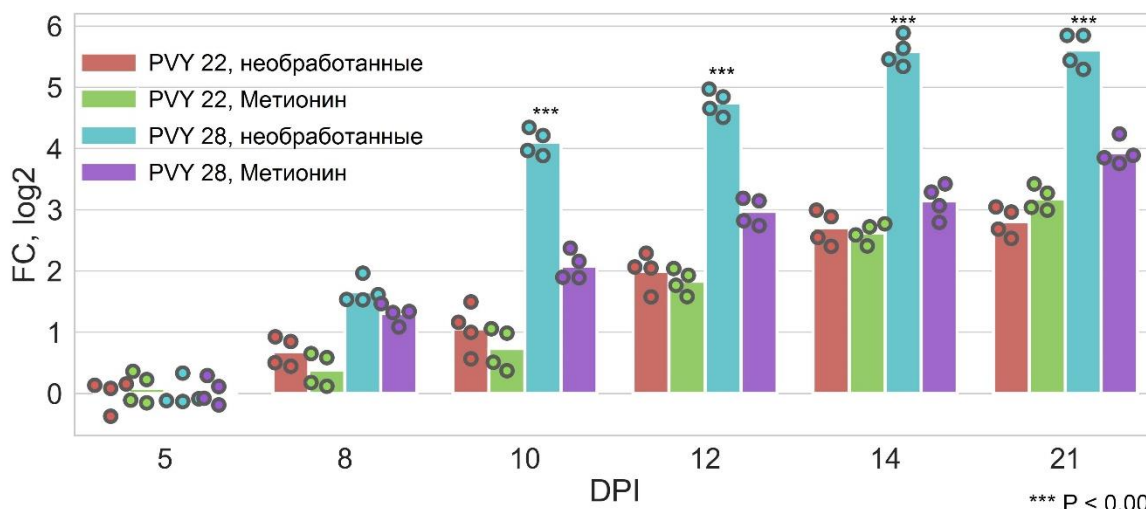


Рис. 12. Соотношение *S*-аденозилметионина (SAM) к *S*-аденозил гомоцистеину (SAH) или **индекс метилирования** на 8, 10 и 14 дни после заражения PVY/мок-инокуляции при 22°C и 28°C. (A) – сорт Чикаго, (B) – сорт Гала.

Эти данные показывают, что контрастные по устойчивости сорта по-разному реагируют на инфекцию PVY на метаболомном уровне, что влияет на изменения уровней накопления SAM, SAH и их соотношение в противоположных направлениях. Устойчивость к PVY у растений сорта Гала, вероятно, связана с увеличением содержания SAM и индекса метилирования, тогда как резкое повышение восприимчивости к PVY у растений Чикаго при высокой температуре сопровождается снижением этих показателей. Это указывает на то, что модуляция метилирования, регулируемая соотношением SAM:SAH, играет важную роль в определении стратегии устойчивости или восприимчивости растений во взаимодействиях вирус-растение.

3.5. Обработка метионином повышает устойчивость растений картофеля восприимчивого сорта Чикаго к инфекции PVY при повышенной температуре

Для проверки влияния изменения метаболома МЦ на восприимчивость картофеля к инфекции PVY, растения сорта Чикаго обработали экзогенным метионином, непосредственным предшественником SAM. Листья картофеля опрыскивали 1,5 мМ раствором L-метионина каждые два дня в течение 3 недель. Контрольную группу заражённых растений опрыскивали водой. В результате уровень накопления вирусной РНК в обработанных метионином системно инфицированных листьях снизился по сравнению с контрольными растениями. При этом, при нормальной температуре обработка метионином не оказала значительного влияния на накопление РНК PVY (Рис.13).



*** P < 0.001

Рис. 13. Влияние обработки L-метионином (MET) на уровень РНК PVY в системно инфицированных листьях растений картофеля сорта Чикаго при 22°C и 28°C на 5, 8, 10, 12, 14 и 21 дни после заражения PVY.

В результате обработки метионином также увеличивалось содержание SAM в заражённых вирусом растениях на фоне повышенной температуры (Рис.14). Однако на уровень накопления SAM такая обработка не оказала значимого влияния. При этом соотношение SAM:SAH у обработанных метионином заражённых растений при 28°C возрастало относительно необработанных растений в тех же условиях (Рис.14). Это свидетельствует о том, что поступающий извне метионин может компенсировать снижение экспрессии ключевых ферментов МЦ и возобновлять процессы метилирования в растениях на нормальном уровне. Интересно, что обработка метионином контрольных здоровых растений и заражённых растений при нормальной температуре не оказала значительного влияния на уровни накопления метаболитов МЦ (Рис.14), что говорит о том, что в данных условиях МЦ работает на оптимальном уровне и не может быть улучшен извне. В совокупности эти данные подтверждают роль метионинового цикла в модулировании восприимчивости растений картофеля к заражению PVY при повышенной температуре.

Таким образом снижение экспрессии основных ферментов МЦ и последующее нарушение его функционирования коррелирует с усилением восприимчивости растений картофеля сорта Чикаго к PVY на фоне повышенной температуры. В соответствии с этим, обработка растений экзогенным метионином приводит к восстановлению уровня накопления метаболитов МЦ и

повышению резистентности к PVY в условиях повышенной температуры. Все это позволяет предполагать, что МЦ играет важную роль в качестве ключевого компонента противовирусной защиты.

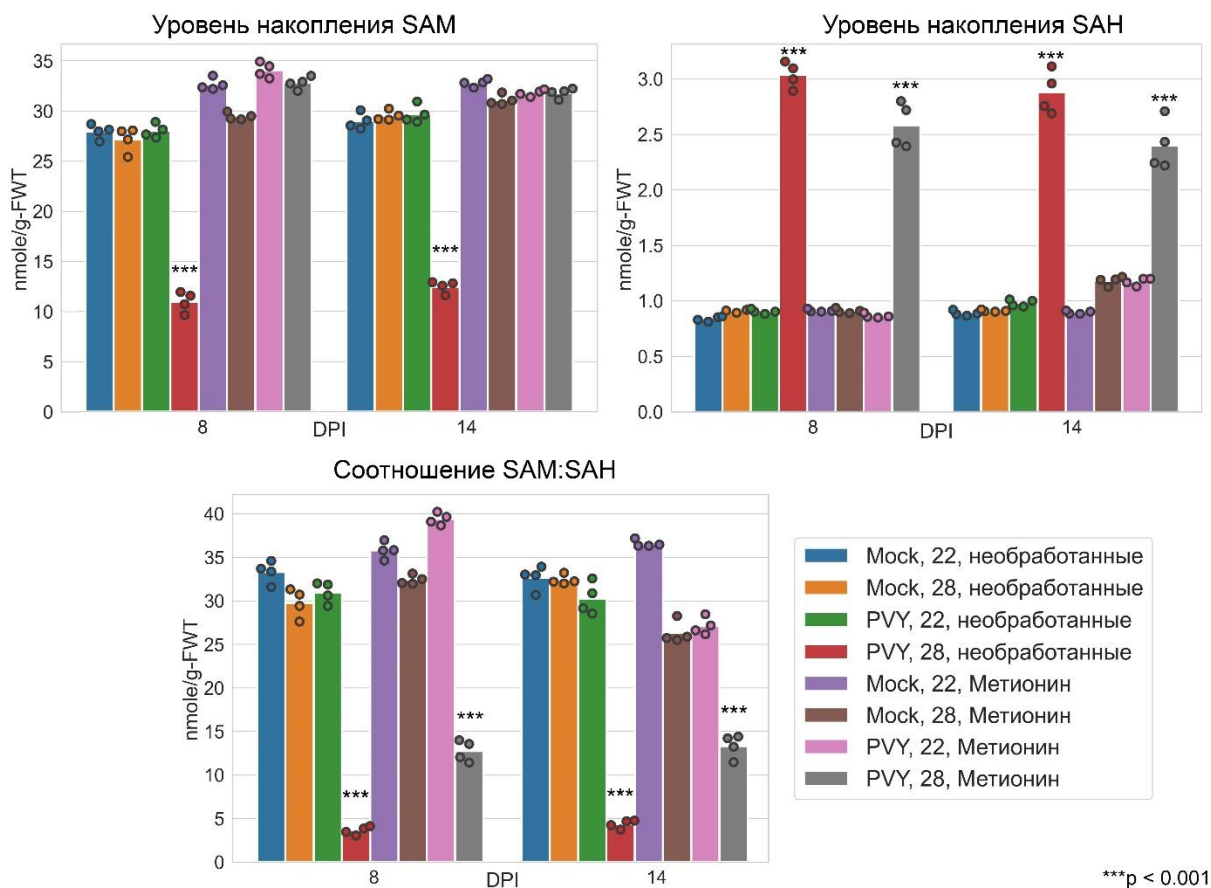


Рис. 14. Влияние обработки *L*-метионином (*MET*) на уровни накопления *S*-аденозилметионина (*SAM*), *S*-аденозил гомоцистеина (*SAH*) и их соотношение в системно инфицированных листьях растений картофеля сорта Чикаго при 22°C и 28°C на 8 и 14 дни после заражения PVY /мозаикоуляции.

3.6. Предполагаемые механизмы, лежащие в основе восприимчивости/устойчивости растений картофеля к вирусной инфекции на фоне повышенной температуры

Скоординированное снижение представленности ключевых ферментов МЦ (*MS*, *SAMS*, *SAH*) и ферментов связанного с ним фолатного цикла (*SHM*, *MTHFR*) в системно инфицированных PVY листьях картофеля сорта Чикаго в условиях теплового стресса на 8 день является одним из значимых результатов нашего исследования. На рисунке 15 представлена модель возможных механизмов ответа растений картофеля восприимчивого сорта Чикаго на комплексный стресс.

Известно, что *SAM*-опосредованное трансметилирование тесно связано с путями РНК-интерференции (РНК-и), в которых миРНК стабилизируются с помощью ассоциированной с МЦ метилтрансферазы *HEN1*, которая 2'-*O*-метирует 3'-концевые нуклеотиды миРНК, используя *SAM* в качестве донора метильной группы (Li *et al.*, 2005, Yu *et al.*, 2005). Одним из возможных механизмов, посредством которого тепловой стресс усиливает восприимчивость растений картофеля к PVY, может быть истощение метилирования миРНК с помощью *HEN1* вследствие уменьшения соотношения *SAM:SAH* (Рис.15.1). Ещё один путь, на который могут

влиять изменения в МЦ – метилирование ДНК у растений (Рис.15.2), которое является одним из эпигенетических факторов, регулирующих экспрессию генов. Метилирование ДНК контролируется несколькими SAM-зависимыми метилтрансферазами растений и поэтому на него могут влиять нарушения в функционировании МЦ (Corgêa *et al.*, 2020). Кроме метилирования ДНК, в формирование ответа растений картофеля на комплексный стресс может быть вовлечено метилирование белков или гистонов (Рис.15.3). Дополнительным фактором, способствующим повышению восприимчивости растений картофеля к вирусной инфекции при повышенной температуре, может быть нарушение синтеза этилена, который также связан с МЦ. Этилен, как и другие фитогормоны, играет важную роль в формировании ответа растений на различные патогены, включая вирусы. Более того, хорошо известно, что этилен может занимать ключевое место при запуске различных путей иммунитета растений (Alazem *et al.*, 2015). Таким образом, возрастающая восприимчивость растений картофеля в этих условиях, может быть определена, например, отсутствием метаболитов МЦ, необходимых для синтеза этилена.

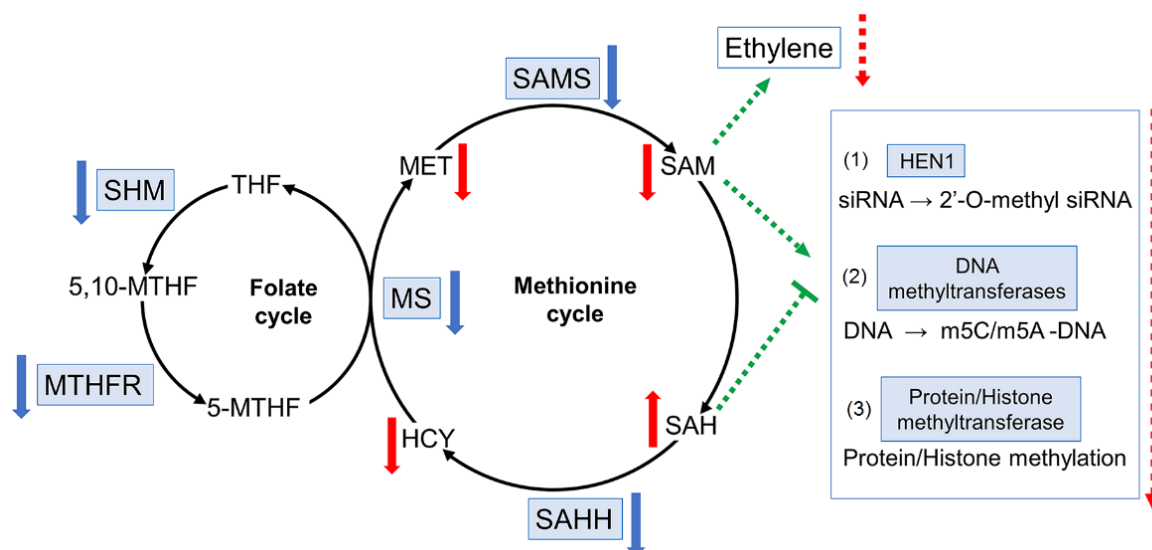


Рис. 15. Модель предполагаемых механизмов, лежащих в основе ответа растений картофеля сорта Чикаго на инфекцию PVY при 28°C: в результате подавления активности ферментов МЦ (синие стрелки) происходят изменения в уровнях содержания метаболитов (красные стрелки). Это может приводить к усилению восприимчивости растений к вирусу через следующие механизмы: (1) Подавление SAM-зависимых реакций метилирования, включая HEN1-направленное метилирование миРНК, и как следствие снижение стабильности противовирусных миРНК. (2) Ингибирование метилтрансфераз, метилирующих ДНК и белки. (3) Ингибирование метилирования белков.

В отличие от сорта Чикаго, представленность ферментов МЦ и экспрессия соответствующих им генов у сорта Гала не подавлялась. Более того, различные наборы ферментов МЦ у сорта Гала в зависимости от температуры (22°C или 28°C) увеличивали свою экспрессию (Рис.16). Однако несмотря на то, что на фоне разных температур росла представленность различных наборов ферментов МЦ: при 22°C – MS, SAMS, SHM, при 28°C – SVL и SHM (Рис.16), увеличение накопления MET и SAM наблюдалось для заражённых PVY растений в обоих случаях. В результате этих изменений соотношение SAM:SAH также увеличилось на фоне обеих температур (Рис.16), причем наиболее заметное увеличение отмечено при 28°C (Рис.12).

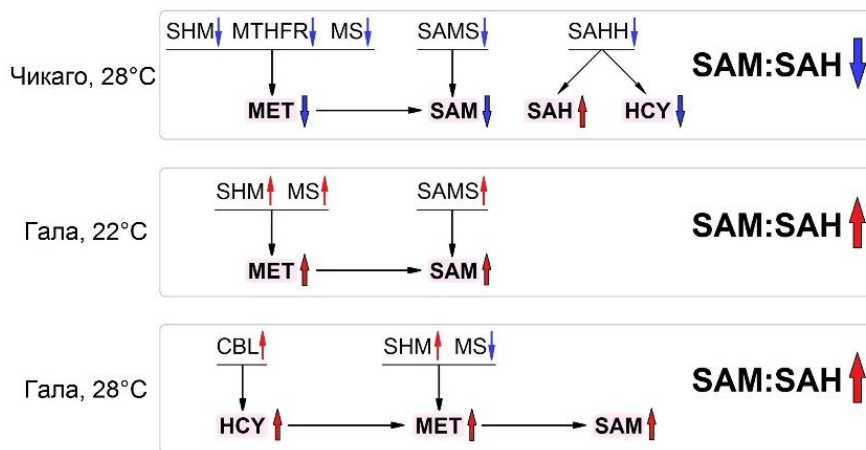


Рис. 16. Схематическое изображение изменений экспрессии ключевых ферментов и накопления метаболитов МЦ в ответ на PVY. Черные стрелки показывают направления потока ферментов и метаболитов. Синие и красные стрелки указывают соответственно на снижение и рост активности.

Один из возможных вариантов развития такой устойчивости заключается в том, что защитный механизм, основанный на РНК-и, может быть усилен за счёт стабилизации вирусспецифических миРНК через процессы метилирования с привлечением SAM-зависимой метилтрансферазы HEN1. Другой возможный механизм может быть связан с эпигенетическим метилированием ДНК или гистонов хозяина, которое, как известно, может быть задействовано в реакциях на биотические и абиотические стрессы (Coppêa *et al.*, 2020). Дополнительным фактором роли МЦ в формировании устойчивости является один из его продуктов – этилен, растительный гормон, который играет важную роль в противовирусном ответе растений (Alazem *et al.*, 2015). Повышенное накопление SAM, который является ключевым компонентом синтеза этилена, может привести к повышению уровня этилена, а следовательно, и к повышению устойчивости к вирусам. Устойчивость картофеля к PVY также может быть связана и с другими защитными реакциями растений, например защитный ответ растения, опосредованный салициловой кислотой (Baebler *et al.*, 2011, Makarova *et al.*, 2018). Некоторые исследования указывают на тесное взаимодействие между защитными путями салициловой кислоты и сигнальными путями, регулируемые этиленом (Li *et al.*, 2019), который синтезируется под контролем МЦ.

Таким образом, вероятность того, что контроль восприимчивости растений к вирусам опирается на какой-либо один регуляторный механизм, крайне мала. Более того, повышение температуры может по-разному модулировать различные реакции растений на вирусные инфекции у разных сортов, как показано в этой работе. Взаимодействие между различными механизмами может быть интегрировано в специфичные объединённые пути, что может способствовать тонкой настройке защитных реакций растений в зависимости от температуры окружающей среды или генотипа.

ВЫВОДЫ

1. Проведён сравнительный количественный протеомный анализ с использованием меточной протеомики (iTRAQ) устойчивого (Гала) и восприимчивого (Чикаго) сортов картофеля в условиях индивидуального (инфекция Y вирусом картофеля, YBK) и комбинированного стресса (вирусная инфекция при повышенной до 28°C температуре).

2. Выявлены группы дифференциально экспрессирующихся белков (ДЭБ), вовлеченных в различные клеточные процессы. Для устойчивого сорта Гала при инфекции YBK и нормальной температуре обнаружены 43 и 189 группы ДЭБ на 8 и 14 дни после заражения, соответственно, тогда как в условиях комбинированного стресса идентифицированы 291 и 399 групп ДЭБ на тех же сроках инфекции. Протеомный ответ восприимчивого сорта Чикаго менее выражен: при инфекции YBK и нормальной температуре идентифицированы 16 и 23 группы ДЭБ, а в условиях комбинированного стресса – 64 и 152 группы ДЭБ на 8 и 14 дни после заражения, соответственно.

3. Показано, что повышенная восприимчивость сорта Чикаго к инфекции PVY на фоне теплового стресса сопровождается снижением уровня основных ферментов метионинового цикла (метионин синтаза (MS), S-аденозилметионин синтаза (SAMS), S-аденозил гомоцистеин гидролаза (SAHH)) и связанного с ним фолатного цикла (серин гидроксиметилтрансфераза (SHM) и метилен тетрагидрофолат редуктаза (MTHFR)) и предшествующим изменением уровня экспрессии соответствующих генов. В результате наблюдается снижение концентрации SAM – донора метильной группы и увеличение накопления SAH, ингибитора SAM-зависимых метилтрансфераз, что приводит к снижению соотношения SAM:SAH, известного как индекс метилирования.

4. Обработка инфицированных растений сорта Чикаго экзогенным метионином, непосредственным предшественником SAM, в условиях теплового стресса значительно ингибирует накопление вирусной РНК в системных листьях растений по сравнению с контролем и сопровождается увеличением индекса метилирования.

5. Устойчивый к стрессам сорт Гала демонстрирует противоположный сорту Чикаго характер изменений протеома и метаболома для ферментов и метаболитов метионинового цикла. В зависимости от температуры содержание различных ферментов возрастает в ответ на вирусную инфекцию. Показано, что концентрация SAM и соотношение SAM:SAH (индекс метилирования) увеличиваются независимо от температуры.

6. Предполагается, что устойчивость/восприимчивость растений к инфекции PVY в условиях теплового стресса у разных сортов картофеля может регулироваться на уровне метионинового цикла, определяющего эффективность реакций трансметилирования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

Spechenkova N., Fesenko I. A., Mamaeva A., Suprunova T. P., Kalinina N. O., Love A. J., & Taliansky M. (2021). The Resistance Responses of Potato Plants to Potato Virus Y Are Associated with an Increased Cellular Methionine Content and an Altered SAM: SAH Methylation Index. *Viruses*, 13(6), 955. DOI: 10.3390/v13060955.

Fesenko I., **Spechenkova N.**, Mamaeva A., Makhotenko A., Love A., Kalinina N. & Taliansky M. (2020). Role of the methionine cycle in the temperature-sensitive responses of potato plants to potato virus Y. *Molecular Plant Pathology*, 22, 77–91. DOI: 10.1111/mpp.13009.

Makarova S., Makhotenko A., **Spechenkova N.**, Love A., Kalinina N. & Taliansky M. (2018). Interactive Responses of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plants to Heat Stress and Infection with Potato Virus Y. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2582. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02582.

Материалы конференций:

1. **Спеченкова Н.А.**, Фесенко И.А., Князев А.Н., Махотенко А.В., Глушкевич А.И., Мамаева А.С., Калинина Н.О., Тальянский М.Э. (2020) Роль метионинового цикла в формировании ответа растений картофеля на Y-вирус картофеля в условиях повышенной температуры. XX всероссийская конференция молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» – 2020. – С. 31-32. Москва, 27-29 октября 2020 г. DOI: 10.48397/ARRIAB.2020.20.014.

2. **Спеченкова Н.А.**, Фесенко И.А., Мамаева А.С., Тальянский М.Э. Поиск белковых маркеров устойчивости картофеля *Solanum tuberosum* к комплексным стрессам методом протеомного профилирования. XXXII Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» – 2020. – С. 31-31. Москва 10-13 февраля 2020 г. eLIBRARY ID: 42516413.

3. **Spechenkova N.**, Mamaeva A., Fesenko I., Kalinina N., Zgoda V., & Taliansky M. (2019). Comparative proteomic analysis of two potato varieties under biotic and complex stresses. In *FEBS OPEN BIO*, Vol. 9(S1): P. 308-308. The 44th FEBS Congress. Краков, Польша, 6-11 июля 2019 г. DOI: 10.1002/2211-5463.12675.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДЭБ – дифференциально экспрессируемые белки

МЦ – метиониновый цикл

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – ПЦР в режиме реального времени

РНК-и – РНК-интерференция

GO term – анализ обогащения по функциональной принадлежности

dpi – дни после инфицирования/days post infection

HSP – белки теплового шока (Heat shock proteins)

iTRAQ – изобарные метки для относительной и абсолютной квантификации (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation)

PVY - Y вирус картофеля (Potato virus Y)