

Использование маркеров плазмодесмы для изучения локализации белков, участвующих в регуляции межклеточного транспорта в растении

Научный руководитель – Комарова Татьяна Валерьевна

Апель Полина Андреевна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: polinochka570@gmail.com

Межклеточный транспорт в высших растениях осуществляется через плазмодесмы (ПД), представляющие собой динамичные структуры, через которые происходит транспорт как низкомолекулярных веществ, так и макромолекул. Пропускная способность ПД интактных зрелых листьев ограничена, однако стрессовые воздействия приводят к изменению апертуры ПД. Помимо каллозы, полисахарида клеточной стенки, пропускную способность ПД определяют различные белковые факторы, вовлеченные в регуляцию межклеточного трафика макромолекул. К таким факторам относятся белки, локализованные непосредственно в ПД, а также белки, ассоциированные с ПД. Недавно был идентифицирован новый стресс-индуцируемый белок растений рода *Nicotiana*, гомолог ингибитора пептидазы Кунитца (KPIIP) [2]. Показано, что он стимулирует межклеточный транспорт. Целью данной работы было определить, является ли KPIIP белком, расположенным в плазмодесме.

Для подтверждения плазмодесмальной локализации белка используют несколько общепринятых методических подходов, основным из которых является оценка ко-локализации исследуемого белка с известными белками-маркерами ПД, а также каллозой.

Эксперименты по определению субклеточной локализации KPIIP, слитого с флуоресцентным тэгом, показали, что (i) KPIIP:RFP не ко-локализуется с каллозой, окрашенной анилиновым синим, (ii) KPIIP:GFP частично ко-локализуется с транспортным белком (MP) вируса табачной мозаики, слитым с RFP (MP_{TMV}:RFP) и (iii) полностью ко-локализуется с другим маркером плазмодесмы - ^{C1}RGP, слитым с RFP.

Другим подходом, позволяющим более точно оценить локализацию двух белков относительно друг друга и выявить взаимодействия между ними, является использование системы бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC) [1]. Данный метод основан на восстановлении флуорофора из двух фрагментов флуоресцентного белка, например, YFP, слитых с исследуемыми белками. Детекция флуоресцентного сигнала указывает на то, что тестируемые белки взаимодействуют между собой *in vivo* или локализуются в клетке достаточно близко для формирования способного к флуоресценции YFP из неактивных фрагментов. В рамках этого подхода были созданы конструкции, кодирующие белки MP_{TMV}, RGP и KPIIP, слитые с N- или C-частью белка YFP. Затем осуществляли попарную совместную экспрессию полученных конструкций и оценивали взаимодействие между белками с помощью флуоресцентной микроскопии. В случае пары MP_{TMV} и RGP флуоресценция YFP восстанавливалась, сигнал был распределен точно по периферии клетки. Таким образом, MP_{TMV} и RGP ко-локализуются и возможно взаимодействуют между собой. В то же время, при использовании пары KPIIP / MP_{TMV} или KPIIP / RGP флуоресценции YFP детектировать не удалось. Полученный результат может указывать на то, что KPIIP и RGP, несмотря на ко-локализацию, в клетке не взаимодействуют и вероятно разделены мембраной.

Источники и литература

- 1) Kerppola T. K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells // *Annu. Rev. Biophys.* – 2008. – Т. 37. – С. 465-487.
- 2) Sheshukova E. V. et al. An alternative nested reading frame may participate in the stress-dependent expression of a plant gene // *Frontiers in Plant Science.* – 2017. – Т. 8. – С. 2137.