

Ж. Қожабек^{1,2*}, Ж.Л. Үй², Ш.Л. Уаң²¹Сәкен Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан²Қытай аграрлық университеті, Пекин, Қытай*Байланыс үшін автор: jaunahojabek@yahoo.com

BBSV вирусы жұғымдалу барысындағы HSP17.6 ақуызының механизміне анализ жасау

Аннотация. BBSV (*Beet black scorch virus*-BBSV) вирусы дүние жүзіне кең таралған қант қызылшасының вирусы болып, қызылшаның қант өндірісіне ауыр экономикалық зиян тудырып, қатысты саладағы зерттеушілердің назарын аударды. Модель өсімдік *Nicotiana Benthamiana*-дан пайдаланып вирустың жұғымдалу барысы мен өсімдіктің ауруға қарсы тұру механизмін зерттеу өте зор ғылыми маңызға ие. Бұдан бұрынғы зерттеулер BBSV вирусымен жұғымдалудан бұрынғы және жұғымдалғаннан кейінгі *Nicotiana Benthamiana*-ға транскриптом секвенирлеу технологиясымен талдау жасау арқылы HSP17.6 ақуызының мөлшері BBSV вирусымен жұғымдалған өсімдікте көрнекті артатынын байқаған.

HSP17.6 ақуызының вирустың жұғымдалуы мен өсімдіктің ауруға қарсы тұру барысындағы рөлін түсіну үшін, HSP17.6 ақуызымен HSP70, HSP90 және BBSV вирусын құрайтын ақуыздардың (BBSV encoded proteins) арасындағы өзара әсер ету жағдайын зерттедік. Зерттеу нәтижесі HSP17.6 ақуызының HSP70, HSP90 ақуызымен өзара әрекеттесетінін (interactions), бірақ BBSV вирусының құрылымдық ақуыздарымен (BBSV encoded proteins) әрекеттеспейтінін көрсетті.

Тәжірибе нәтижесіне және бұрынғы зерттеулерге негізделгенде, HSP70 және HSP90 ақуыздарына көмекшілік рөл атқаратын HSP17.6 ақуызы молекулалық шаперон (molecular chaperone) қызметін атқару арқылы BBSV вирусының жұғымдалуы мен көбеюіне қажетті құрылымдық ақуыздарының фолдингіне (fold) көмектеседі.

Түйін сөздер: HSP17.6 ақуызы, BBSV, фолдинг, жұғымдалу механизмі, локализация.

DOI: 10.32523/2616-7034-2021-135-2-38-47

Кіріспе

BBSV (*Beet black scorch virus*) вирусы диаметрі 30 nm шар тәрізді вирус. BBSV вирусы жұғымдалған қызылшаның жапырағында қара дақтар пайда болып, барлық жапырағы қурап, тамыры өледі. Сол себепті BBSV вирусы деп аталады.¹ BBSV вирусының геномы жалпы ұзындығы 3644 nt, жалғыз тізбекті мағыналы РНҚ (single strand positive sense RNA), 5'-үшінде VPg жоқ, 3'-үшінде Poly(A) жоқ. BBSV вирусында жалпы 6 ORF (Open reading frame) бар болып, олар жеке-жеке репликацияланумен қатысты P23 (BBSV эндоплазмада репликацияланады), оқушы ақуыз P82 (read through protein), қозғалысқа қатысты P7a, P7b, P5' ақуыздары және вирустың қабықша ақуызы (Coat protein, CP).²

HSP (Heat shock proteins) өсімдік және жануарлар жасушасында көптеп кездесетін болып, организм денесіне вирус жұғымдалу барысында көп мөлшерде синтезделеді. Қалыпты жасушаның өсіп-жетілу барысында, жасушадағы шаперон қызметін атқаратын HSP ақуызы басқа ақуыздардың фолдингі, транслокациясы және деградациясы қатарлы функцияларына қатысады.³ Сонымен қатар тиімсіз орта жағдайында, HSP ақуызы жасушаның қалыпты тіршілік қимылының сақталуына көмектеседі. Молекуланың массасына байланысты HSP бес топқа бөлінеді: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 және sHSP (small heat shock protein).⁴ Жақынғы жылдардан бері, HSP70 ақуызының вирустың жұғымдалу барысында яғни вирустың жасушаға кіруі (viral entry), түзілуі (virion assembly and disassembly), репликациясы және вирус генінің экспрессиясы барысында

маңызды қызмет атқаратыны байқалды. Сонымен қатар, HSP70 ақуызының вирус қызметіне қалай әсер ететіні терең зерттеліп болды.⁵

Ал sHSP тобы (шағын хитчок ақуыздары) бактерия, өсімдік және жануарлар денесінде көп мөлшерде синтезделетін болып, молекулалық салмағы 15-30 кДа шамасында болады. Бұл sHSP тобындағы ақуыздарының бәріне ортақ бір концевативті, шамамен 100 амин қышқылынан құралған, А кристаллин линзасы тәрізді домені бар,⁶ оның екі ұшы өте тұрақсыз болады. Организм денесінен сырт жағдайда, sHSP тобы 12-40 мономерден құралған олигомер формасында сақталады. Ал аз санды sHSP тобындағы ақуыздар мономер, димер немесе тетрамер формасында сақталады.⁷ sHSP ақуызының субстратты тануы және онымен бірігуі өте маңызды. sHSP ақуызының басқа HSP тобындағы ақуыздардан айырмашылығы, sHSP ақуызы басқа ақуыздарының топталуына кедергілік жасау барысында АТФ энергиясын керек етпейді. Дене сыртында, sHSP ақуызы тез арада субстратымен әрекеттесіп, оның топталуына кедергілік жасап, әуелгі қалпында сақтап тұрады. Бірақ sHSP ақуызы басқа ақуыздарының қайталай фолдингын дербес орындай алмайды, HSP70, HSP90 қатарлыларға көмекшілік қызмет атқарады.⁸ sHSP ақуыздарының өсімдік вирусының жұғымдалуын реттеу үдерісін әлі де терең зерттеуге тура келеді.

Материал және әдісі

Материал: 2×SYBR Green Master PCR және праймерлер (QIAGEN компаниясынан сатып алынды, таблица 1 де көрсетілді); BBSV-CP арнайы антиденелері, қДНК, TRV-VIGS vector, TRV-HSP17.6, және GST-PULL DOWN-ға сәйкес барлық ақуыздары мен антиденелер зертханамызда сақталған.

Әдісі: Реал-тайм ПТР-дің (Real-time PCR) реакциясына қажет материалдар: 2×SYBR Green PCR master mix-8 µl; 10Mm primer-0.4 µl; cDNA-1µl; көлемін 16 µl-ге дейін су құйып толтырамыз, толық араластырғаннан кейін 14 µl аламыз. Реакцияласу шарт-жағдайы: 95°C pre-degeneration-3min; 95°C degeneration-10s; 60°C-та 10s реакцияластыру; 39 рет қайталау (cycle).

Кесте 1

Праймерлер

Атауы	праймерлер тізбегі	Түсініктеме
pGDG-HSP17.6-F	5'-GAAGATCTATGTCACCTGATCCCAAG-3'	HSP17.6 ақуызының жасушадағы локализациясы үшін қолданылады, тура бағыттағы праймер
pGDG-HSP17.6-R	5'-CGCGTCGACCTAACCGGTGATCTCAATG-3'	HSP17.6 ақуызының жасушадағы локализациясы үшін қолданылады, кері бағыттағы праймер
pSPY-HSP17.6-F	5'-GGACTAGTATGTCACCTGATCCCAAGAGTGTTCGGC-3'	ViFC-ға жұмсалатын тура бағыттағы праймер
pSPY-HSP17.6-R	5'-GGGGTACCACCGGTGATCTCAATGGACTTGACATC-3'	ViFC-ға жұмсалатын кері бағыттағы праймер
HSP17.6-real-F	5'-CAATGGACTTGACATCAGGCTTC-3'	Realtime PCR-ға жұмсалатын тура бағыттағы праймер
HSP17.6-real-R	5'-ATAAGAATGATACTTGGCACCGT-3'	Realtime PCR-ға жұмсалатын кері бағыттағы праймер
PR1-real-F	5'-TTAGCAGCCGTCATGAAATCGT-3'	PR1 мөлшерін анықтауға істетілетін тура бағыттағы праймер
PR1-real-R	5'-GGCGTAGAACCTTTAACCTGGGA-3'	PR1 мөлшерін анықтауға істетілетін кері бағыттағы праймер

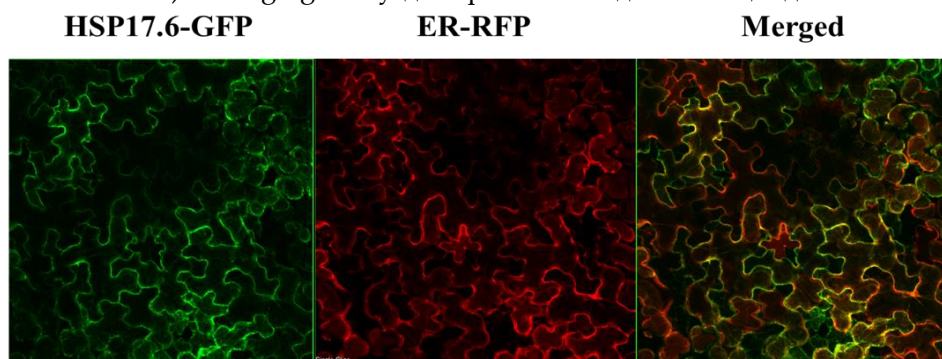
GST pull-down: көлемі 15µl болатын GST beads-ді 1ml буфермен 5 рет біркелкі толық араластырылды, әр жолы 3 минуттан. Одан кейін салмағы 100µg болатын GST-пептиді бар ақуыз қосылды, 3 сағат шайқап инкубациялағаннан кейін, 800xg жылдамдығымен 10 секунд центрифугалап, супернатанты алып тасталды, сосын 50µg болатын байлынысушы ақуызды құйып, тағы 3 сағат реакцияластырылды. Одан кейін 800xg жылдамдығымен 10 секунд центрифугалау арқылы beads-ді жинап алып, көлемі 1ml болатын шайғыш буфермен әр жолы 3 минуттан 5 рет жуылды. Ең соңында вестерн-блот әдісін пайдалану арқылы нәтижесі тексерілді.

BiFC: Walter қатарлылар істеткен әдісті пайдаланып, (Walter ат., 2004), бактерияны 3 мл қатысты антибиотик қамтылған LB өсіру сұйықтығына араластырып, 28°C, 210rpm инкубаторда 14-16 сағат өсіреміз. 4000rpm, 8 минут центрифугалап, ұқсас көлемдегі агробактерия суспензиясының буферімен араластырғаннан кейін, бактериалды ерітіндінің OD600 мөлшерін ультрафиолет спектрофотометрімен өлшейміз. P19 және өзара әрекеттесетін ақуыздарымен сұйықтар арқылы OD600 мөлшерін 0.3 ке теңшейміз, 28°C инкубаторда 3 сағат қойғаннан кейін, *Nicotiana benthamiana*-ның жапырағына жұғымдатамыз. 3 күннен кейін лазерлі конфокалды микроскоп арқылы ақуыздарының әрекеттесу жағдайы қаралды.

Нәтиже

NbHSP17.6-нің жасушадағы локализациясы (Subcellular localization of NbHSP17.6):

NbHSP17.6 ақуызының клетка ішіндегі таралу жағдайын анықтау үшін, NbHSP17.6 ақуызын экспрессия векторындағы GFP-дің карбоксил ұшына жалғап, агробактерия инфекциясы (*Agrobacterium injection*) тәсілі арқылы өсімдік денесінде транзистентті экспрессияладық (transient expression). Үш күннен кейін, лазер конфокалды микроскоп (laser confocal microscope) арқылы NbHSP17.6 ақуызының таралу жағдайын анықтадық. Тәжірибе нәтижесі NbHSP17.6 ақуызының эндоплазмада (co-localization with endoplasm) таралатынын көрсетті (Сурет 1). Бірақ NbHSP17.6 ақуызы клетка қабықшасында (cell membrane), микро жіпшеде (microfilament), клетка аралық жіпшеде (plasmodesmata) және golgi body-да таралмайтындығы байқалды.

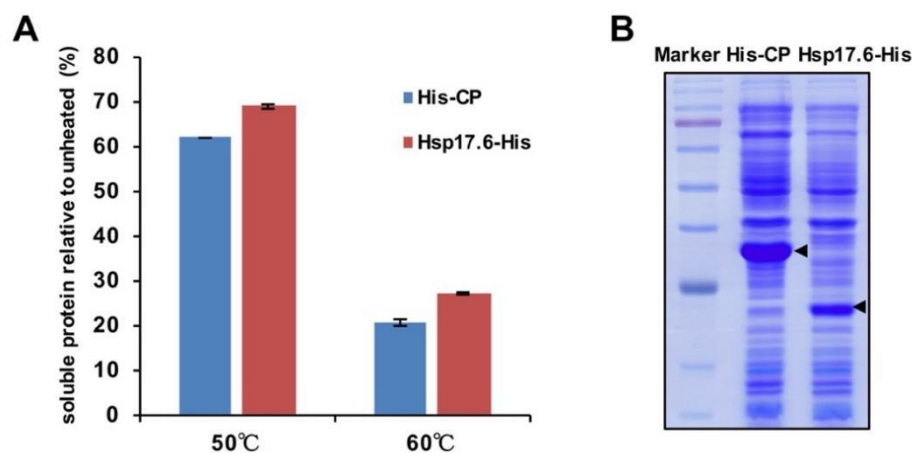


Сурет 1. NbHSP17.6-нің жасушадағы локализациясы (Subcellular localization of NbHSP17.6).

NbHSP17.6-нің молекулалық шаперон қызметіне анализ жасау (Analysis for molecular chaperones function of NbHSP17.6):

NbHSP17.6 ақуызында молекулалық шаперон (molecular chaperone) рөлінің бар-жоқтығын анықтау үшін, pET30a-HSP17.6 прокариоттық экспрессия векторын жасап, *E.coli*-дың экспрессиялық штаммы BL21 (DE3)-ден пайдаланып NbHSP17.6-His-ді синтездеп алдық. Жоғары температурада өңдегеннен кейін, ерігіш ақуыз (soluble protein) өзгеріп, денатурациясы (denaturation) қалыптасады. Тұнбаның салыстырмасына негізделіп, молекулалық шаперон (chaperone) рөлінің бар-жоқтығына талдау жасадық. Тәжірибе нәтижесі, 50°C және 60°C температурада, NbHSP17.6-His қамтылған ерігіш ақуыз (soluble protein) құрамындағы жалпы ақуыздың мөлшері бақылау тобындағы ақуыз His-CP-ға қарағанда көп болды. Бұдан

молекулалық шаперон (molecular chaperone) рөлі жоқ CP-мен салыстырғанда, NbHSP17.6 ақуызы жоғары температурада басқа ақуыздағы әуелгі қалпында сақтап, денатурациясының (denaturation) алдын алатынын байқадық (Сурет 2).

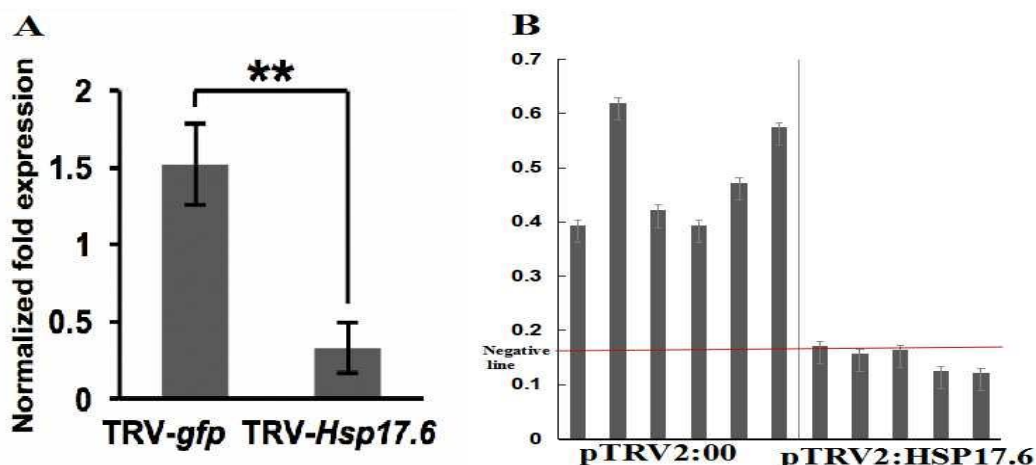


Сурет 2(A). Жоғары температураның ұқсамаған ақуыз қамтылған *E.coli* жалпы ерігіш ақуыздарына ықпалы. (Effect of heat treatment on the stability of soluble total protein of *E.coli* containing different exogenous proteins). Қоюлығы жеке-жеке 0.2, 0.3, 0.5, 0.6, 0.75 және 0.9 мг/мл болатын BSA ертіндісін Dye Reagent Concentrate-пен 40 минут реакцияластырып, OD595-тегі абсорбансын өлшегеннен кейін, ақуыздың қоюлығын абсцисса өсі, OD595-ті ордината өсі деп белгілеп, стандартты қисық сызық жасадық. Жалпы ерігіш ақуыздарды жеке-жеке қалыпты температурада, 50°C және 60°C та 15 минут өңдегеннен кейін, центрифугалау арқылы супернатантының OD595-ін өлшеп, стандартты қисық сызыққа негізделіп ақуыздың қоюлығын есептедік. (B). Экстрогенді ақуыздардың экспрессиясы.

NbHSP17.6 ақуызының экспрессиясы тежелгеннен кейінгі BBSV вирусының инфекциясындағы өзгерісі (detection of BBSV infection after silence of NbHSP17.6):

NbHSP17.6 ақуызының BBSV вирусы жұғымдалу барысындағы рөлін ішкерілей зерттеу үшін, TRV-VIGS системасынан пайдаланып, NbHSP17.6 ақуызын өсімдік денесінен арылтық (silencing NbHSP17.6 gene by TRV-VIGS system). BBSV вирусы жұғымдалғаннан кейін, өсімдіктегі NbHSP17.6 ақуызы мен вирус мөлшерін анықтадық. Тәжірибе нәтижесі өсімдік денесіндегі NbHSP17.6 ақуызының мөлшері көрнекті дәрежеде азайғандығын көрсетті (Сурет 3A).

TRV-VIGS системасы арқылы NbHSP17.6 ақуызының өсімдік денесіндегі мөлшерінің көп мөлшерде азайғандығына көз жеткізгеннен кейін, BBSV вирусымен жұғымдап, BBSV CP-ға телімді антиденеден пайдаланып, ELISA әдісі арқылы BBSV вирусының мөлшеріне талдау жасадық. Зерттеу нәтижесіне негізделгенде, қалыпты өсімдікпен (Healthy controls) салыстырғанда, NbHSP17.6 ақуызы жоғалтылған (NbHSP17.6 was silenced) өсімдікте BBSV вирусының мөлшері көрнекті азайған (Сурет 3B). Бұдан бұрынғы зерттеулерде, BBSV вирусы ауыр дәрежеде жұғымдалған өсімдікте NbHSP17.6 ақуызының мөлшері көрнекті көбейгендігі дәлелденген. Жоғардағы зерттеулермен бірлестіре отырып, NbHSP17.6 ақуызы өсімдіктің ауруға қарсылық көрсету қабілетін төмендетіп (negatively regulate the resistant of plant), BBSV вирусының жұғымдалуына көмектесуі (upregulate the infection of BBSV) мүмкін деген тұжырым жасадық.



Сурет 3(A). TRV-VIGS векторының инфекциясынан кейін NbHSP17.6-нің салыстырмалы экспрессиясын анықтау үшін жасалған реал-тайм ПТР. EF1a ішкі параметр ретінде алынды, bars стандартты қателікті, жұлдызша көрнекі айырмашылықты көрсетеді (student's t-test, ** $p < 0.01$). (B). Егілген әр өсімдіктің жапырақтарындағы BBSV вирусін ELISA әдісі арқылы анықтау. Контроль тобы pTRV1 және бос pTRV2:00 векторы егілген өсімдіктер.

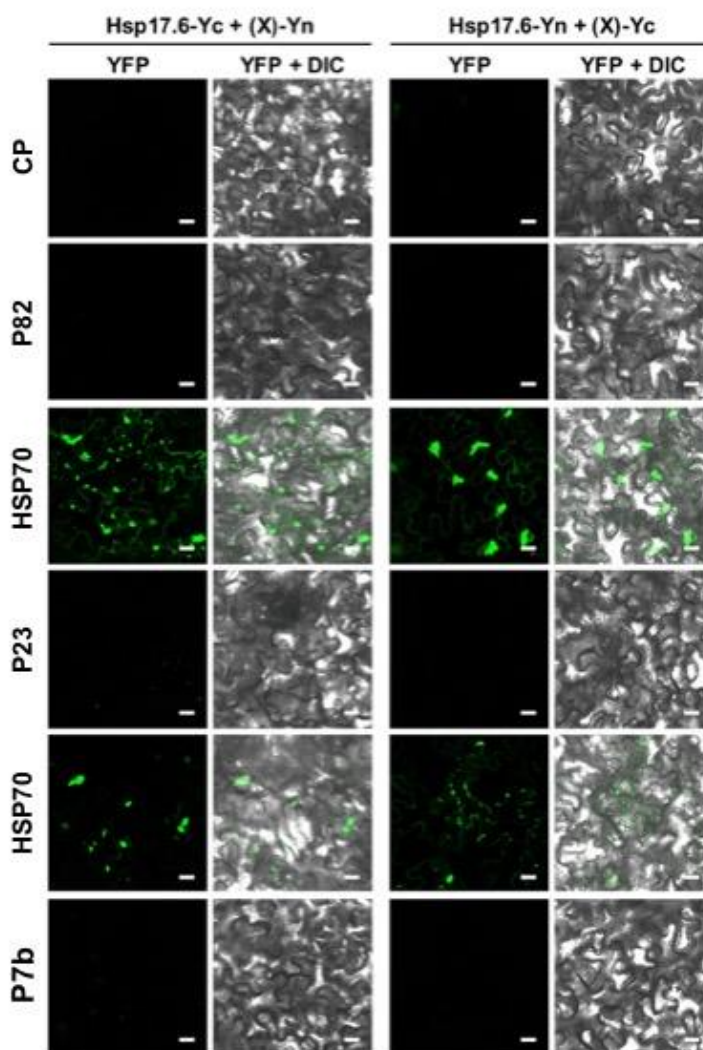
HSP17.6-нің HSP70 және HSP90 ақуыздарымен өзара әрекеттесуі:

HSP17.6 ақуызы BBSV вирусы инфекциясына кем болса болмайтын маңызды рөл атқарады. Онда HSP17.6 ақуызы бұл маңызды рөлін BBSV вирусін құрайтын ақуыздарымен өзара әрекеттесу арқылы атқарып отырма? Бұған көз жеткізу үшін біз организм денесі ішінде және сыртында HSP17.6 ақуызының BBSV вирусының ақуыздарымен (BBSV encoded proteins), HSP70 ақуызымен және HSP90 ақуызымен өзара әрекеттесу (interactions) жағдайын зерттедік.

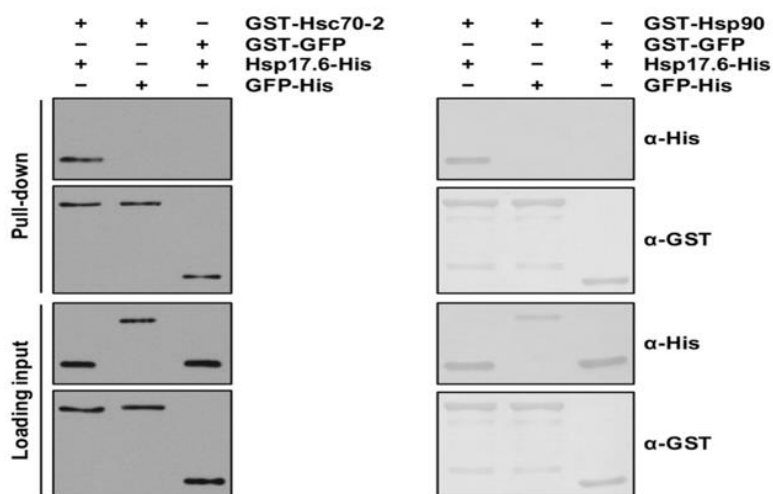
BiFC техникасының (Организм денесі ішіндегі) нәтижесінде тек HSP70-HSP17.6 және HSP90-HSP17.6 қоспасында ғана YFP сигналы байқалған. Ал HSP17.6 мен BBSV құрылымдық ақуыздары P23, P82, CP және P7b қоспаларында YFP сигналы байқалмады (Сурет 4). BiFC техникасының нәтижесін тағы бір қырынан анықтау үшін, дене сыртында GST-преципитация тәжірибесін жасадық.

GST-преципитация тәжірибесі барысында, pGEX-GST векторынан пайдаланып, GST-HSP70 және GST-HSP90-ді синтездеп алдық. вестерн-блот нәтижесі HSP17.6-His дене сыртында GST-HSP70 және GST-HSP90-мен әрекеттесетіндігін көрсетті. Ал GST-GFP және GFP-His қатарлы контроль группада өзара әрекеттесу байқалмады (Сурет 5).

Жоғарыдағы нәтижелер HSP17.6 ақуызының тек HSP70 және HSP90 ақуыздарымен әрекеттесетінін, ал BBSV вирусының ақуыздарымен әрекеттеспейтінін көрсетті.



Сурет 4. BiFC техникасынан пайдаланып, HSP17.6 ақуызымен басқа қатысты ақуыздарының өзара әрекеттесу жағдайын зерттеу.



Сурет 5. GST-преципитация тәсілі арқылы, HSP17.6 ақуызымен HSP70, HSP90 ақуыздарының өзара әрекеттесу жағдайын зерттеу.

Талқылау және қорытынды

Жануарларда sHSP ақуыздарының вирус жұғымдалуына әсері кең және терең зерттелген, бірақ өсімдіктерде қатысты зерттеулер өте сирек. Әрі ұқсамаған вирустардың жұғымдалу барысындағы sHSP ақуызының атқаратын қызметі ұқсамайды. Мысалы, ақ дақ синдромының вирусы (white spot syndrome virus) HSP21 ақуызының мөлшерін азайтады; қызанақ дақтары вирусы (tomato spotted wilt virus) HSP20 ақуызының мөлшерін көбейтеді.⁹ Зерттеулерге негізделгенде, sHSP ақуызы ұқсамаған вирустың әртүрлі компоненттерімен әрекеттеседі. Мысалы, HCV вирусының құрамындағы NS5A мен HSP27 өзара әрекеттеседі. TYLCSV-дің қабықша ақуызы (coat protein) мен тасымалдаушы *bemisia tabaci*-дің VtHSP16 ақуызының өзара әрекеттеседі.¹⁰ Сонымен қатар, әр түрлі sHSP ақуызының вирустың жұғымдалу барысындағы қызметі де ұқсамайды. Кейбірі вирустың жұғымдалуын тездетеді, кейбірі вирустың жұғымдалуын тізгіндейді.¹¹ Бірақ sHSP ақуызының вирустың жұғымдалу барысына нақтылы қалай әсер ететіні әлі де белгісіз күйінде қалып отыр.

HSP17.6 ақуызының BBSV вирусының жұғымдалу барысындағы маңызды рөлін зерттеу үшін, TRV-VIGS системасынан пайдаланып HSP17.6 ақуызының синтезделуін тежегеннен кейін, BBSV вирусын өсімдікке жұғымдаттық. Тәжірибе нәтижесі вирустың мөлшері салыстырмалы түрде төмен болатынын көрсетті. Яғни HSP17.6 ақуызы вирустың өсімдік денесіне жұғымдалуына көмектеседі.

Сонымен қатар, BiFC және преципитация техникаларынан пайдаланып, HSP17.6 ақуызының BBSV вирустық ақуыздарымен, HSP70 ақуызымен және HSP90 ақуызымен өзара әрекеттесу жағдайын зерттедік. Зерттеу нәтижесі HSP17.6 ақуызының HSP70 және HSP90 ақуыздарымен әрекеттесетінін, бірақ BBSV вирустық ақуыздарымен әрекеттеспейтінін көрсетті. Бұдан бұрынғы зерттеулерде, BBSV вирусының эндоплазмада көбейетінін (replication), BBSV вирусының репликазасы (replicase) P23-тің HSP70 және HSP90 ақуыздарымен өзара әрекеттесетінін, HSP70 ақуызы болмаған жағдайда BBSV вирусының көбейе алмайтындығын дәлелдеген.¹²

Бұдан бұрынғы зерттеулер мен өз тәжірибе нәтижемізді бірлестіре отырып, HSP17.6 ақуызы эндоплазмада таралатынын, HSP17.6 ақуызы HSP70 және HSP90 ақуыздарының P23-тің дұрыс құрылым түзуіне көмектесу барысында молекулалық шаперон рөлін атқаратынын анықтадық. Осы арқылы HSP17.6 ақуызы вирустың жұғымдалу барысына әсерін тигізуі мүмкін деген қорытынды шығардық.

Әдебиеттер тізімі

1. Cao Y. *et al.* The complete nucleotide sequence of Beet black scorch virus (BBSV), a new member of the genus Necrovirus// Archives of Virology. -2002. -Vol. 147. -P. 2431-2435.
2. Yuan X. *et al.* Analysis of the subgenomic RNAs and the small open reading frames of Beet black scorch virus// Journal of General Virology. -2006. -Vol. 87. -P. 3077.
3. Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K. & Chowdhuri, D. K. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far?// Life Sciences. -2010. -Vol. 86. -P. 377-384.
4. Kotak, S. *et al.* Complexity of the heat stress response in plants// Current Opinion in Plant Biology. -2007. -Vol. 10. -P. 310-316.
5. Vega, V. L. *et al.* Hsp70 Translocates into the Plasma Membrane after Stress and Is Released into the Extracellular Environment in a Membrane-Associated Form that Activates Macrophages 1// Journal of Immunology. -2008. - Vol. 180. -P. 4299.
6. Hanazono, Y. *et al.* Nonequivalence Observed for the 16-Meric Structure of a Small Heat Shock Protein, SpHsp16.0, from *Schizosaccharomyces pombe*// Structure. -2013. -Vol. 21. -P. 220-228.

7. Leroux, M. R., Ma, B. J., Batelier, G., Melki, R. & Candido, E. P. Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins// *Journal of Biological Chemistry*. -1997. -Vol. 272. -P. 12847-12853.
8. Fu, X. *et al.* Small heat shock protein IbpB acts as a robust chaperone in living cells by hierarchically activating its multi-type substrate-binding residues// *Journal of Biological Chemistry*. -2013. -Vol. 288. -P. 11897-11906.
9. Liu, P., Wang, L., Kwang, J., Yue, G. H. & Wong, S. M. Transcriptome analysis of genes responding to NNV infection in Asian seabass epithelial cells// *Fish Shellfish Immunol.* -2016. -Vol. 54. -P. 342-352.
10. Ohnesorge, S. & Bejarano, E. R. Begomovirus coat protein interacts with a small heat-shock protein of its transmission vector (*Bemisia tabaci*)// *Insect Molecular Biology*. -2010. -Vol. 18. -P. 693-703.
11. Nakatsue, T. *et al.* Acute Infection of Sindbis Virus Induces Phosphorylation and Intracellular Translocation of Small Heat Shock Protein HSP27 and Activation of p38 MAP Kinase Signaling Pathway// *Biochemical & Biophysical Research Communications*. -1998. -Vol. 253. -P. 59-64.
12. Moshe, A., Gorovits, R., Liu, Y. & Czosnek, H. Tomato plant cell death induced by inhibition of HSP90 is alleviated by Tomato yellow leaf curl virus infection// *Molecular Plant Pathology*. -2016. -Vol. 17. -P. 247-260.

Zh. Kozhabek^{1,2}, J.L. Yu², X.L. Wang²

¹*S. Seifullin Kazakh Agro Technical University, Nur-Sultan, Kazakhstan*

²*China Agricultural University, Beijing, China*

Analysis of the HSP17.6 protein mechanism in BBSV infection

Abstract. Beet black scorch virus (BBSV) has been reported as a natural pathogen of sugar beet and distributed all over the world, causing great economic losses to the sugar industry. Research on interactions between BBSV and its host by using model plant *Nicotiana benthamiana* is significantly important and necessary for understanding virus infection process and exploring plant resistance mechanism. The results of sequencing the transcriptome of *N. benthamiana* infected with BBSV as well as gene screening in response to viral infection revealed upregulation of the small heat shock protein 17.6 gene (NbHSP17.6) and the effect of the protein on resistance to the virus. To further examine the involvement of HSP17.6 in defense responses in *N. benthamiana*, we tested interaction between HSP17.6 and other heat shock proteins such as HSP70 and HSP90 as well as BBSV encoded proteins. The results showed that HSP17.6 interacted with HSP70 and HSP90 but not with BBSV encoded proteins. When combined with other available results, it is possible that HSP17.6 acted as a small molecular chaperone to facilitate proper refolding of the specific proteins HSP70 and HSP90 required for BBSV infection and/or replication.

Key words: HSP17.6, BBSV, fold, infection mechanism, localization.

Ж. Қожабек^{1,2}, Ж.Л. Уй², Ш.Л. Уаң²

¹*Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина,
Нур-Султан, Казахстан*

²*Китайский аграрный университет, Пекин, Китай*

Анализ белкового механизма HSP17.6 при инфицировании вирусом BBSV

Аннотация. Вирус черной свеклы (Beet black scorch virus-BBSV) является широко распространенным патогеном, причиняющим значительный экономический ущерб свеклольно-сахарному производству. Учитывая значимость вируса, последний является объектом

пристального внимания исследователей. Большое научное значение имеют изучение процесса заражения вирусом, а также исследование механизма устойчивости растений к возбудителю на основе растительной модели *Nicotiana benthamiana*. Результаты секвенирования транскриптома *N. benthamiana*, инфицированного BBSV, а также скрининг генов в ответ на вирусную инфекцию выявили повышенное регулирование гена небольшого белка теплового шока 17.6 (NbHSP17.6) и влияние белка на устойчивость к вирусу. Для того чтобы понять роль HSP17.6 белка в борьбе с вирусом и противовирусной инфекцией, мы исследовали взаимодействие HSP17.6 белка с другими белками теплового шока HSP70 и HSP90, а также другими белками, кодирующими вирус черной свеклы. Результаты исследования показали, что HSP17.6 белок взаимодействует с белками HSP70 и HSP90, но не взаимодействует с белками, кодирующими вирус BBSV. В сочетании полученных нами результатов с другими доступными результатами, возможно, что HSP17.6 действовал в качестве небольшого молекулярного шаперона для облегчения правильного рефолдинга специфических белков HSP70 и HSP90, необходимых для инфекции BBSV и/или его репликации.

Ключевые слова: HSP17.6, BBSV, фолд, механизм заражения, локализация.

References

1. Cao Y. et al. The complete nucleotide sequence of Beet black scorch virus (BBSV), a new member of the genus Necrovirus, *Archives of Virology*, 147, 2431-2435 (2002).
2. Yuan X. et al. Analysis of the subgenomic RNAs and the small open reading frames of Beet black scorch virus, *Journal of General Virology*, 87, 3077 (2006).
3. Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K. & Chowdhuri, D. K. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far, *Life Sciences*. 86, 377-384 (2010).
4. Kotak, S. et al. Complexity of the heat stress response in plants, *Current Opinion in Plant Biology*. 10, 310-316 (2007).
5. Vega, V. L. et al. Hsp70 Translocates into the Plasma Membrane after Stress and Is Released into the Extracellular Environment in a Membrane-Associated Form that Activates Macrophages 1, *Journal of Immunology*. 180, 4299 (2008).
6. Hanazono, Y. et al. Nonequivalence Observed for the 16-Meric Structure of a Small Heat Shock Protein, SpHsp16.0, from *Schizosaccharomyces pombe*, *Structure*. 21, 220-228 (2013).
7. Leroux, M. R., Ma, B. J., Batelier, G., Melki, R., & Candido, E. P. Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins, *Journal of Biological Chemistry*. 272, 12847-12853 (1997).
8. Fu, X. et al. Small heat shock protein IbpB acts as a robust chaperone in living cells by hierarchically activating its multi-type substrate-binding residues, *Journal of Biological Chemistry*. 288, 11897-11906 (2013).
9. Liu, P., Wang, L., Kwang, J., Yue, G. H. & Wong, S. M. Transcriptome analysis of genes responding to NNV infection in Asian seabass epithelial cells, *Fish Shellfish Immunol*. 54, 342-352 (2016).
10. Ohnesorge, S. & Bejarano, E. R. Begomovirus coat protein interacts with a small heat-shock protein of its transmission vector (*Bemisia tabaci*), *Insect Molecular Biology*. 18, 693-703 (2010).
11. Nakatsue, T. et al. Acute Infection of Sindbis Virus Induces Phosphorylation and Intracellular Translocation of Small Heat Shock Protein HSP27 and Activation of p38 MAP Kinase Signaling Pathway, *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 253, 59-64 (1998).
12. Moshe, A., Gorovits, R., Liu, Y. & Czosnek, H. Tomato plant cell death induced by inhibition of HSP90 is alleviated by Tomato yellow leaf curl virus infection, *Molecular Plant Pathology*. 17, 247-260 (2016).

Авторлар туралы мәлімет:

Ж. Қожабек – биология ғылымдарының магистрі, С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің биология ғылымдары кафедрасының оқытушысы, Орынбор 12, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Ж.Л. Үй – биология ғылымдарының докторы, Қытай аграрлық университетінің профессоры, Юан миң юан 2, Пекин, Қытай.

Ш.Л. Уаң – биология ғылымдарының докторы, Қытай аграрлық университетінің оқытушысы, Юан миң юан 6, Пекин, Қытай.

Zh. Kozhabek – master of biological sciences, teacher at the department of biological sciences, Saken Seifullin Kazakh agrotechnical university, Orynbor 12, Nur-Sultan, Kazakhstan.

J.L. Yu – doctor of biological sciences, professor of China agricultural university, Yuan ming yuan 2, Beijing, China.

X.L. Wang – doctor of biological sciences, teacher of China agricultural university, Yuan ming yuan 6, Beijing, China.