

Н. Й. Пархоменко, Л. О. Максименко, Л. Ф. Діденко

Ферментативна активність мРНК-структур із рослин, інфікованих плюс- та мінус-геномними фітовірусами картоплі

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Я. Співаком)

*Встановлено, що синтез вірусних білків у безклітинній системі *in vitro* в основному здійснюється на вільних та мембранозв'язаних полісомних мРНК. Але найбільше включення мітки відмічається в мембранозв'язаних неполісомних мРНК із рослин, інфікованих вірусом кучерявої карликовості картоплі, та з рослин, інфікованих Х-вірусом картоплі. Припускається, що ці асоційовані з мембранною структурою містять полімерази і здатні активно *in vitro* синтезувати РНК та направляти синтез запрограмованих в РНК білків. Ця тенденція відмічається для мРНК, ізольованих із рослин, уражених як мінус-геномним вірусом кучерявої карликовості картоплі, так і плюс-геномним Х-вірусом картоплі. В системі реплікації *in vitro* репліказна активність мРНК-структур також більшою мірою виявлялася в мембранозв'язаних структурах.*

Важливе значення при дослідженні вірусів, у тому числі і вірусів рослин, приділяється реалізації інформації, закодованої в геномах вірусів, де ключову роль відіграють процеси синтезу РНК і білка. Білковий синтез є складовою частиною експресії генів.

Відомо, що РНК більшості вірусів рослин мають матричну активність і в клітинах еукаріот перебувають в асоціації з білками протягом всієї своєї життєдіяльності, утворюючи рибонуклеопротеїнові комплекси (РНП), які беруть участь в реалізації генетичної інформації. Певна частина РНК в комплексі з білками бере участь у процесі трансляції і існує у вигляді мРНК в асоціації з рибосомами, утворюючи полісоми або полісомні мРНК, а інша частина в основному не транслюється і представлена вільними цитоплазматичними мРНК. У ході реплікації можливий синтез субгеномних РНК, транспорт яких відбувається у вигляді вільних цитоплазматичних мРНК.

При виявленні РНК-залежної РНК-полімерази у складі вірусоспецифічних мРНК, інфікованих Х-вірусом картоплі (ХВК), нами було встановлено, що активність цього ферменту значно перевищувала активність РНК-реплікази із здорових рослин. Тому можна припустити, що мРНК можуть функціонувати як реплікативні структури і брати участь у синтезі вірусспецифічних РНК. Розподіл мРНК-структур різної клітинної локалізації, визначення в їх складі РНК-репліказної та матричної активності і стало предметом наших досліджень.

Для вирішення поставленого завдання виділяли мРНК різної клітинної локалізації із рослин дурману, уражених ХВК (Київський штам), та із рослин махорки, уражених вірусом кучерявої карликовості картоплі (ВККК), за описаною раніше методикою [1, 2].

РНК-полімеразну активність визначали в інкубаційній суміші, яка містила 0,1 М *трис*-HCl, рН 8,0; 0,002 М MgCl₂, 0,0025 М дитіотреїтолу, 0,0125 М (NH₄)₂SO₄ та по 0,0001 М АТФ, ЦТФ і ГТФ, 6 мкКі ¹⁴C УТФ; 30 мкг мРНК [1].

Для визначення матричної активності мРНК-структур *in vitro* використовували безклітинну білоксинтезуючу систему з лізату ретикулоцитів кролика. Кількість імпульсів за 1 хв підраховували на лічильнику "Beckman LS-7800" [2].

© Н. Й. Пархоменко, Л. О. Максименко, Л. Ф. Діденко, 2015

ХВК є типовим представником роду *Potexvirus*, родини *Flexviridae* [3]. Цей рід характеризується тим, що має плюс-сенсау геномну односпірально РНК, яка є інфекційною та матрично активною в білоксинтезуючій системі *in vitro*, і кодує п'ять відкритих рамок зчитування. Геномна РНК ХВК безпосередньо транслюється як моноцистронна, має 5'-кеп-структуру і 3'-полі-А-последовність. Цикл реплікації/транскрипції РНК ХВК включає утворення не тільки плюс- і мінус-повнорозмірних ланцюгів, а також і субгеномних мРНК. Так, друга-п'ята рамки зчитування експресуються шляхом синтезу і трансляції субгеномної мРНК. Отже, геном ХВК кодує чотири неструктурних білка і один структурний білок оболонки [4].

ВККК належить до родини рабдовірусів, до якої входить широке коло патогенів людини, тварин і рослин. Вони не тільки морфологічно схожі, а й генетично споріднені. Геном рабдовірусів має односпірально мінус-сенсау геномну РНК, яка не інфекційна і не має матричної активності. Вона сформована у сферичний нуклеопротеїновий РНК-комплекс, так званий нуклеокапсид, який упаковується у віріони і служить матрицею для РНК-залежного РНК-полімеразного синтезу [5]. Після проникнення вірусу в клітину комплекс активізується і на мінус-спіральній РНК, як на матриці, за допомогою ферменту транскриптази, що входить до складу вірусного нуклеокапсиду, синтезуються плюс-сенсау РНК. Новосинтезовані плюс-РНК виконують роль мРНК для синтезу нових або допоміжних реплікаційних білків, а також відіграють роль матриці для синтезу нових мінус-сенсау РНК [6, 7]. На відміну від плюс-геномних вірусів мінус-геномні рабдовіруси мають декілька типів білків, які входять до складу віріону і забезпечують експресію вірусного геному [5].

Згідно з одержаними нами результатами дослідження в системі *in vitro*, мРНП різної клітинної локалізації, ізольовані із рослин махорки, уражених мінус-геномним фіторабдовірусом ВККК, і рослин дурману, інфікованих плюс-геномним ХВК, істотно відрізняються за репліказною активністю. Найвищий рівень репліказної активності структур із рослин, інфікованих ВККК, відмічали в мембранозв'язаних неполісомних (2200400 імп/хв) і в мембранозв'язаних полісомних (784500 імп/хв) мРНП (рис. 1, а). Рівень репліказної активності мРНП із рослин, інфікованих ХВК, найвищим був у мембранозв'язаних полісомних (760940 імп/хв), приблизно в 2,5 раза меншим — у мембранозв'язаних неполісомних (270080 імп/хв), ще меншим і приблизно однаковим — у вільних полісомних і вільних неполісомних мРНП (див. рис. 1, б).

Зважаючи на те, що в мРНП комплексах виявлена РНК-репліказна активність, а це значить, що досліджувані мРНП містять РНК-репліказу і здатні синтезувати РНК *in vitro*, цікаво було дослідити функціональні можливості мРНП структур щодо синтезу білків *in vitro*. Для цього було проведено ряд експериментів, в яких у білоксинтезуючій системі матрицею служила інформаційна РНК з набором білків у складі мРНП.

Виходячи з одержаних нами даних (рис. 2), всі структури різної клітинної локалізації, виділені з інфікованих ВККК рослин махорки, виявляли матричну активність в білоксинтезуючій системі *in vitro*. Найбільш вираженою матричною активністю характеризувалися мембранозв'язані неполісомні мРНП — 24830 імп/хв. Матрична активність мРНП мембранозв'язаних полісом була нижчою порівняно з такою мембранозв'язаних неполісомних мРНП, але вищою за матричну активність вільних полісомних мРНП і становила 5270 імп/хв. Вільні цитоплазматичні неполісомні мРНП із рослин махорки, уражених ВККК, практично нездатні стимулювати в безклітинній системі *in vitro* синтез запрограмованих в мРНК білків — усього 1740 імп/хв.

Особливу увагу слід звернути на високу білоксинтезуючу функцію мембранозв'язаних неполісомних мРНП, хоча ця структура знаходиться в мінімальній кількості в рослинах,

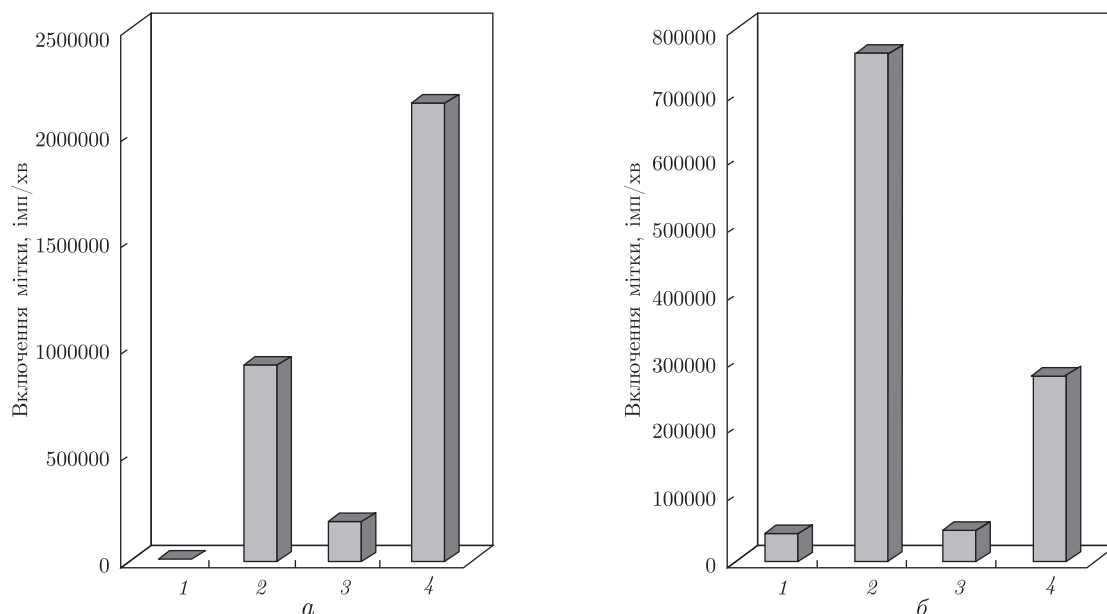


Рис. 1. Репліказна активність мРНК різної клітинної локалізації в безклітинній системі *in vitro*: *a* — із рослин махорки, інфікованих ВККК; *б* — із рослин дурману, інфікованих ХВК. 1 — вільні полісомні мРНК; 2 — мембранозв'язані полісомні мРНК; 3 — вільні неполісомні мРНК; 4 — мембранозв'язані неполісомні мРНК

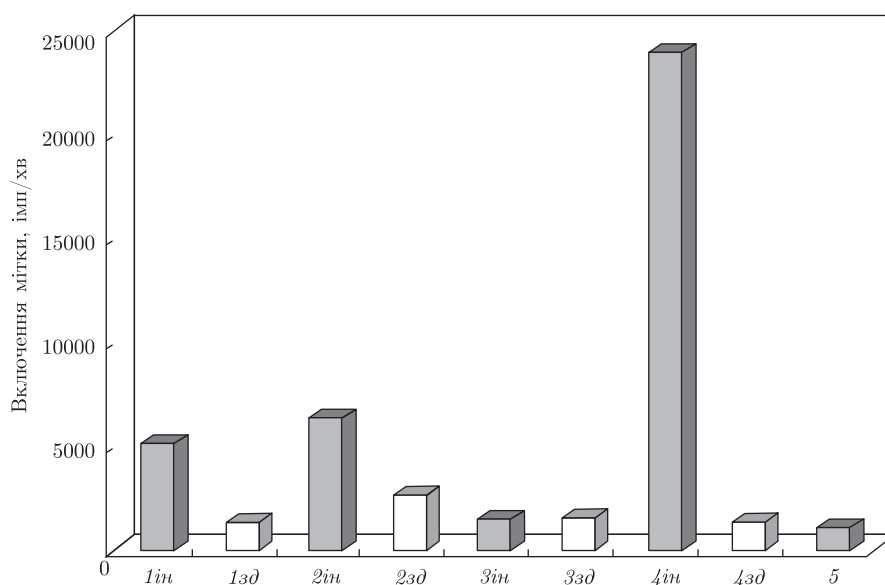


Рис. 2. Матрична активність мРНК різної клітинної локалізації з інфікованих ВККК (*in*) та здорових рослин (*zd*) махорки в системі *in vitro*: 1 — вільні полісомні мРНК; 2 — мембранозв'язані полісомні мРНК; 3 — вільні неполісомні мРНК; 4 — мембранозв'язані неполісомні мРНК; 5 — ендогенний синтез

інфікованих як ВККК, так і ХВК. Також і інформаційна РНК, виділена з мембранозв'язаних неполісомних мРНК, мала в безклітинній системі *in vitro* найвищу матричну активність порівняно з мРНК, виділеною з вільних і мембранозв'язаних полісом. Матрична активність

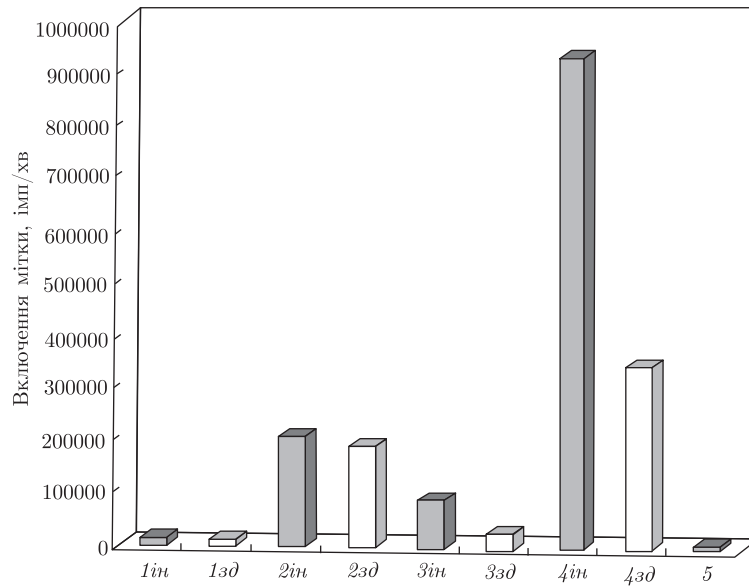


Рис. 3. Матрична активність мРНК різної клітинної локалізації з інфікованих ХВК (*in*) та здорових (*zd*) рослин дурману в системі *in vitro*:

1 — вільні полісомні мРНК; 2 — мембранозв'язані полісомні мРНК; 3 — вільні неполісомні мРНК; 4 — мембранозв'язані неполісомні мРНК; 5 — ендогенний синтез

вільних неполісомних мРНК була найнижчою, хоча в кількісному співвідношенні ця структура превалює над всіма іншими видами мРНК. Це відповідає літературним даним відносно вірусу везикулярного стоматиту, згідно з якими майже вся (більш 90%) функціональна інформаційна РНК міститься в цитоплазматичних неполісомних мРНК, а інша частина знаходиться в полісомних мРНК [2].

Одержані результати свідчать на користь того, що закономірність, характерна для білоксинтезуючої активності мРНК із рослин, уражених ВККК, майже аналогічна такій для мРНК, ізольованих з інфікованих ХВК рослин (рис. 3). І в тому, і в другому випадку найвищу матричну активність мали мембранозв'язані неполісомні мРНК. У всіх дослідях для мРНК із здорових рослин спостерігалася низька матрична активність у білоксинтезуючій системі *in vitro*. Це свідчить про те, що в інфікованих ХВК і ВККК клітинах рослин переважає вірусіндукований або вірусоспецифічний синтез білків.

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що мембранозв'язані мРНК структури як полісомні, так і неполісомні із рослин, уражених ВККК і ХВК, в безклітинних системах *in vitro* мають здатність більш активно синтезувати вірусні РНК і білки. Саме ці структури в системах *in vitro* здійснювали найбільш ефективно включення мітки в продукт синтезу (РНК — в системі реплікації, а білка — в білоксинтезуючій системі).

Досягнення останніх років у вивченні реплікації потексвірусів показали, що репліказа потексвірусів — це одиночний білок, який містить метилтрансферазну-РНК-хеліказну і РНК-полімеразну активності. Було виявлено, що ізольовані реплікази з інфікованих ХВК рослин асоційовані з мембранами клітин [8]. Згідно з літературними даними, синтез G-білка рабдовірусів здійснюється на мембранозв'язаних полісомних мРНК. Синтез глікопротеїнів на зв'язаних з мембранами полісомах має важливе біологічне значення, оскільки посттрансляційні модифікації цих білків відбуваються в процесі транспорту з жорстких мембран

у гладенькі мембрани ендоплазматичного ретикулума, а потім у плазматичні мембрани, де відбувається збирання вірусних часток. Що ж стосується вільних цитоплазматичних неполісомних мРНК, то в системі трансляції і реплікації *in vitro* вони виявляють дуже низьку активність, хоча теж мають РНК-залежну РНК-полімеразу. Їх функція зводиться, мабуть, до транспорту і запасу генетичної інформації в клітині [9].

Відомо, що вільні цитоплазматичні мРНК являють собою заново синтезовану мРНК, надлишок мРНК після транскрипції, який не транслюється, а також запасні, або так звані масковані мРНК, які транслюються тільки за певних фізіологічних умов. При цьому в складі вільних цитоплазматичних мРНК виявляється більша кількість білків, ніж у полісомних мРНК. Накопичені літературні дані про комплекси мРНК, в тому числі й ті, що виявлені в асоціації з рибосомами, вказують на те, що структура і склад таких рибонуклеїнових комплексів є рухливими і динамічними. Можливо, до складу вільних цитоплазматичних мРНК входять регуляторні білки, які контролюють трансляцію мРНК [9, 10].

Отже, зміни в структурі і в складі мРНК-структур, ізольованих з інфікованих плюс- і мінус-геномними фітовірусами рослин, вказують на важливу та вирішальну роль, яку можуть відігравати ці структури на різних етапах метаболізму мРНК та в процесах регуляції експресії генів.

1. Пархоменко Н. Й., Діденко Л. Ф., Максименко Л. А., Дяченко Н. С. Ферментативная активность нуклеокапсидных белков фиторабдовируса курчавой карликовости картофеля // Микробиол. журн. – 2004. – **66**, № 1. – С. 19–28.
2. Пархоменко Н. Й., Діденко Л. Ф., Максименко Л. О., Дяченко Н. С. Матрична активність мРНК різної клітинної локалізації із рослин, інфікованих мінус-геномним вірусом кучерявої карликовості картоплі в білоксинтезуючій системі *in vitro* // Микробиол. журн. – 2011. – **73**, № 3. – С. 54–60.
3. Adams M. J., Antoniw J. F., Bar-Joseph M., Brunt A. A., Candresse T., Foster G. D., Martelli G. P., Milne R. G., Zavrjev S. K., Fauquet C. M. The new plant virus Family Flexiviridae and assesment of molecular criteria for species demarcation // Arch. Virol. – 2004. – **149**. – P. 1045–1060.
4. Verchot-Lubicz J., Ye C.-M., Bamunusinghe D. Molecular biology of potexviruses: recent advances // J. Gen. Virol. – 2007. – **88**, No 6. – P. 1643–1655.
5. Albertini A. A., Wernimont A. K., Muziol T., Ravellin R. B., Clapier C. R., Schoehn G., Weissenhorn W., Ruigrok R. W. Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein RNA complex // Science. – 2006. – **313**. – P. 360–363.
6. Whelan S. P., Barr J. N., Wertz G. W. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses // Curr. Top. Immunol. – 2004. – **283**, No 1. – P. 61–119.
7. Тутов Л. П. Вирусы и эукариотические клетки: стадии взаимодействия, стратегии экспрессии геномов, репродукция и исходы вирусной инфекции // Мед. журн. – 2008. – № 1. – С. 10–16.
8. Yu B., Chapman E. J., Yang Z., Carrington J. C., Chen X. Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in Arabidopsis // FEBS Lett. – 2006. – **580**. – P. 3117–3120.
9. Mavrakis M., Mehonas S., Real E. Rabies virus chaperone // Virology. – 2006. – **349**, No 2. – P. 422–429.
10. Redinbaugh M. G., Hogenhout S. A. Plant rhabdoviruses // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2005. – **292**, No 1. – P. 143–163.

Н. И. Пархоменко, Л. А. Максименко, Л. Ф. Диденко

Ферментативная активность мРНК-структур из растений, инфицированных плюс- и минус-геномными фитовирусами картофеля

Установлено, что синтез вирусных белков в бесклеточной системе in vitro в основном осуществляется на свободных и мембраносвязанных полисомных мРНК. Однако наибольшее включение метки отмечается в мембраносвязанных неполисомных мРНК из растений, инфицированных вирусом курчавой карликовости картофеля, и из растений, инфицированных X-вирусом картофеля. Допускается, что эти ассоциированные с мембраной структуры содержат полимеразу и способны активно синтезировать РНК и направлять синтез запрограммированных в РНК белков in vitro. Эта тенденция отмечается для мРНК, изолированных из растений, пораженных как минус-геномным вирусом курчавой карликовости картофеля, так и плюс-геномным X-вирусом картофеля. В системе репликации in vitro репликазная активность мРНК-структур также в большей мере выявлялась в мембраносвязанных структурах.

N. I. Parkhomenko, L. A. Maksimenko, L. F. Didenko

Fermentative activity of mRNP-structures from plants infected by plus- and minus-genome phytorhabdoviruses of potato

It is shown that the synthesis of virus proteins in a free cell system is carried out mainly by free and membrane-associated polysomal mRNP. But the most incorporation of a label has been noticed in the membrane-associated nonpolysomal mRNP from plants infected by curly potato dwarf virus and potato virus X. It is assumed that these membrane-associated structures have polymerase and can actively synthesize RNA and proteins in a free cell system. This tendency is noted for mRNP isolated from plants infected by (-)-genome curly potato dwarf virus and by (+)-genome potato virus X. The most replicase activity of mRNP structures has been found in the replicative system in vitro containing membrane-associated structures.