

МАТРИЧНА АКТИВНІСТЬ мРНП РІЗНОЇ КЛІТИННОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ ІЗ РОСЛИН, ІНФІКОВАНИХ МІНУС-ГЕНОМНИМ ВІРУСОМ КУЧЕРЯВОЇ КАРЛИКОВОСТІ КАРТОПЛІ В БЛОКСИНТЕЗУЮЧІЙ СИСТЕМІ IN VITRO

Використовуючи структури мРНП різної клітинної локалізації, виділених із рослин, уражених мінус-геномним вірусом кучерявої карликовості картоплі (ВККК), встановлено, що синтез структурних вірусних білків *in vitro*, в основному здійснюється на мембранозв'язаних та вільних полісомних мРНП, які здатні направляти в безклітинних блоксинтезуючих системах синтез запрограмованих в мРНК білків.

Отримані нами результати показують, що синтез вірусних білків найбільш активно здійснюється на мембранозв'язаних неполісомних мРНП – 23520 імн/хв. Аналогічний розподіл матричної активності спостерігається і у тому випадку, коли до блоксинтезуючої системи вносились мРНК, ізольована із мРНП різної клітинної локалізації.

Найменша матрична активність спостерігалась у цитоплазматичних неполісомних мРНП, які мало активні в системі трансляції *in vitro* – всього 1890 імн/хв. Можливо, функція вільних цитоплазматичних неполісомних мРНП зводиться в основному, мабуть, до транспорту і запасу генетичної інформації в клітині.

Ключові слова: вірус кучерявої карликовості картоплі (ВККК), мРНП, матрична активність.

Віруси з несегментованою мінус-геномною РНК порядку *Mononegavirales*, до якої відносяться і досліджувані нами вірус – вірус кучерявої карликовості картоплі (ВККК), містить мінус-РНК, яка неінфекційна і не має матричної активності, а мРНК транскрибується з батьківської РНК за допомогою ферменту РНК-полімерази, що входить до складу вірусного нуклеокапсиду [8, 14, 18, 19].

На відміну від плюс-геномних вірусів мінус-геномні рабдовіруси мають у складі віріону декілька типів білків, які забезпечують експресію вірусного геному. Особливість рабдовірусів ще і в тому, що матрицею для реплікації і транскрипції являється не вільна РНК, а вірусний рибонуклеопротейд (РНП) – молекула РНК, рівномірно покрита вірус-специфічним білком (N). З вірусним РНП міцно асоційовані молекули РНП-полімерази і ще одного білку, який бере участь у синтезі РНК [6, 8, 12, 14, 15]. У складі віріону ВККК нами була виявлена РНК-залежна РНК-полімераза [4], яка транскрибує вірусну геномну РНК з негативною полярністю в плюс-мРНК [15, 19].

Відомо, що РНК більшості вірусів рослин має матричну активність і в клітинах еукаріот існують у комплексі з білками, утворюючи при цьому рибонуклеопротейновий комплекс або мРНП [6, 12]. Рибонуклеопротейнові комплекси беруть участь у реалізації генетичної інформації, відрізняючись при цьому як по своїй структурі, так і по функціям [9, 17], тобто деяка частина мРНП у складі мембранозв'язаних та вільних полісом бере участь в процесах трансляції, а інша частина мРНП являє собою вільні цитоплазматичні РНП, які не зв'язані з полісомами і, як правило, не транслуються [13]. З літературних джерел відомо про той факт, що РНК здійснює свій транспорт в інші клітини рослини, протискуючись через плазмодесми у формі РНП і утворюючи стійкий комплекс з білками [11, 13].

Раніше нами було встановлено, що мРНП різної клітинної локалізації мають репліказну, полі-А-полімеразну та протеїнкіназну активність [3]. Враховуючи важливе значення структур мРНП в процесах біогенезу мРНК, важливо було виявити матричну активність цих структур, тобто мРНП в білок синтезуючій системі *in vitro*.

Матеріали і методи. В своїх дослідженнях використовували вірус кучерявої карликовості картоплі (ВККК), виявлений і описаний Ф.Ю. Козарем із співавторами і люб'язно наданий нам для роботи. Рослини махорки (*Nicotiana rustica*) заражали соком хворих рослин.

В окремих випадках рослини інфікували нативним вірусом у концентрації 1мг/мл. Очистку вірусу здійснювали за методикою, описаною раніше [2].

Виділення вільних та мембранозв'язаних полісомних і неполісомних мРНК, а потім ізолювання з цих структур мРНК, проводили за методикою, описаною в літературі [1] як із уражених ВККК рослин, так і зі здорових.

Для проведення досліджень у системі трансляції *in vitro* використовували безклітинну систему, одержану нами із лізату ретикулоцитів кролика [1]. Систему готували самостійно, вводячи кролику підшкірно по 2,5 мл ацетилфенілгідрозину (10мг/мл, рН 7,5) щодня протягом 4-х днів.

В результаті проведеної роботи отриманий лізат ретикулоцитів кролика перед використанням обробляли мікрококковою нуклеазою для зниження матричної активності ендогенних мРНК. Частина лізату, обробленого нуклеазою, відразу ж використовували, а решту зберігали в рідкому азоті.

Проба інкубаційної суміші об'ємом 50 мкл для проведення трансляції *in vitro* містила 0,02М Hepes, рН 7,6, 0,12М К-ацетату, 0,003М Mg-ацетату; 0,001М АТФ (Serva), 0,00002М ГТФ (Serva), 0,008М креатинфосфату (Serva), 2мкг/мл креатинфосфокінази (Serva), 0,002М дітіотреїтолу, 0,00004М спермідину (Serva), 0,012М суміші амінокислот без метіоніну (Serva), 4мкСі ¹⁴С-міченого метіоніну, 3мкг тРНК із зародків пшениці, 20мкл лізату ретикулоцитів кролика, 4мкг мРНК або мРНК. Для аналізу включення мітки в синтезований білок, із кожної проби відбирали по 5мкл суміші і наносили на паперові фільтри (Whatmann 3ММ). Після висушування фільтри вносили в розчин, який містив 80 мл ацетону і 10 мл 50 % трихлоруксусної кислоти (ТХУ), обережно струшуючи, змішували 10 хв, потім послідовно відмивали 10 % гарячим розчином ТХУ, тричі 5 % ТХУ і, нарешті, 96 % етанолом [5]. Фільтри висушували, вносили в флакони з сцинтиляційною рідиною і визначали включення мітки на лічильнику «Beckman LS-7800».

Результати та їх обговорення. Про матричну природу РНК у складі мРНК свідчить той факт, що ізолювана з мРНК-комплексів РНК направляла синтез білків у гетерологічних безклітинних системах *in vitro* [7]. Виявлення матричної активності в білоксинтезуючій системі *in vitro* з використанням як матриць мРНК різної клітинної локалізації, виділених із рослин, уражених (-)-геномним вірусом кучерявої карликовості картоплі, і стало предметом наших досліджень.

Для вирішення поставленого завдання ми виділяли мРНК різної клітинної локалізації із рослин, уражених ВККК. Отримані структури мРНК аналізували на спектрофотометрі «Spectord» при довжині хвилі 260 нм (рис.1). та визначали плавучу щільність, яка є однією із основних характеристик ізолюваних структур. Для вільних полісомних мРНК, виділених із рослин, уражених ВККК, плавуча щільність в CsCl складала 1,4 г/см³, для вільних цитоплазматичних неполісомних мРНК – 1,5 г/см³, для мембранозв'язаних полісомних мРНК – 1,36 г/см³ та для неполісомних мембранозв'язаних мРНК – 1,47 г/см³ [3]. Слід зазначити, що при отриманні структур мРНК різної клітинної локалізації в кількісному співвідношенні було виділено вільних цитоплазматичних неполісомних структур на порядок більше, ніж вільних полісомних мРНК та мембранозв'язаних структур.

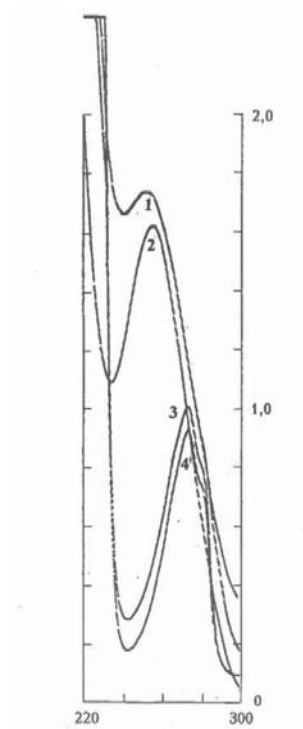


Рис. 1. УФ-спектр мРНК різної клітинної локалізації із рослин, уражених вірусом кучерявої карликовості картоплі:

- 1 – вільні цитоплазматичні неполісомні мРНК;
- 2 – вільні полісомні мРНК;
- 3 – мембранозв'язані полісомні мРНК;
- 4 – мембранозв'язані неполісомні мРНК

Після необхідних приготувань, визначену кількість мРНК різної клітинної локалізації вносимо в систему трансляції *in vitro*. Виходячи з отриманих даних, поданих на рис. 2 видно, що інформаційна РНК в усіх досліджуваних нами структурах мРНК направляла синтез білків в блоксинтезуючій системі *in vitro*, про що свідчило включення мітки в продукт, що синтезується. Проте найбільш вираженою матричною активністю характеризувались мембранозв'язані неполісомні мРНК, виділені з інфікованих ВККК рослин махорки – 23520 імп/хв. Матрична активність мРНК мембранозв'язаних полісом була нижчою порівняно з матричною активністю мембранозв'язаних неполісомних мРНК і складала 5145 імп/хв, але вищою від матричної активності вільних полісомних мРНК, яка складала 4890 імп/хв.

Цитоплазматичні неполісомні мРНК із рослин махорки, уражених ВККК, практично нездатні стимулювати в безклітинній системі *in vitro* синтез запрограмованих в мРНК білків – 1890 імп/хв. У всіх випадках для полісомних і неполісомних мРНК із здорових рослин спостерігалась низька матрична активність в блоксинтезуючій системі *in vitro*, в той час як в інфікованих рослинних клітинах переважає вірусіндукований або вірусоспецифічний синтез білків.

Як уже зазначалося, особливу увагу слід звернути на високу блоксинтезуючу функцію мембранозв'язаних неполісомних мРНК, хоча в рослинній клітині ця структура знаходиться в мінімальній кількості. Саме цікаве є те, що інформаційна РНК, виділена з мембранозв'язаних неполісомних мРНК, також мала найвищу матричну активність порівняно з мРНК, виділеною із вільних і мембранозв'язаних полісомних мРНК (рис. 3). Ці мембранозв'язані неполісомні мРНК зв'язані з цитоскелетною сіткою в клітині. При цьому присутність рибосом не являється необхідною умовою для зв'язування мРНК з цитоскелетною сіткою. Так, в клітинах *HeLa*, інфікованих вірусом везикулярного стоматиту, в процесі трансляції була виявлена вірусна мРНК, короткочасно асоційована з цитоскелетом клітини [10].

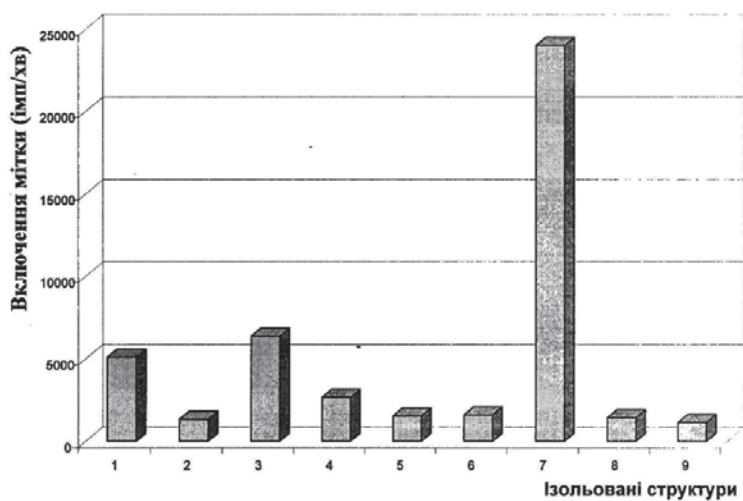


Рис.2. Матрична активність мРНП різної клітинної локалізації із інфікованих ВККК та здорових рослин махорки в системі in vitro

1. – вільні полісоми з рослин, уражених ВККК;
2. – вільні полісоми із здорових рослин;
3. – мембранозв’язані полісоми із рослин, уражених ВККК;
4. – мембранозв’язані полісоми із здорових рослин;
5. – вільні неполісомні мРНП із рослин, уражених ВККК;
6. – вільні неполісомні мРНП із здорових рослин;
7. – мембранозв’язані неполісомні мРНП із рослин, уражених ВККК;
8. – мембранозв’язані неполісомні мРНП із здорових рослин;
9. – ендогенний синтез

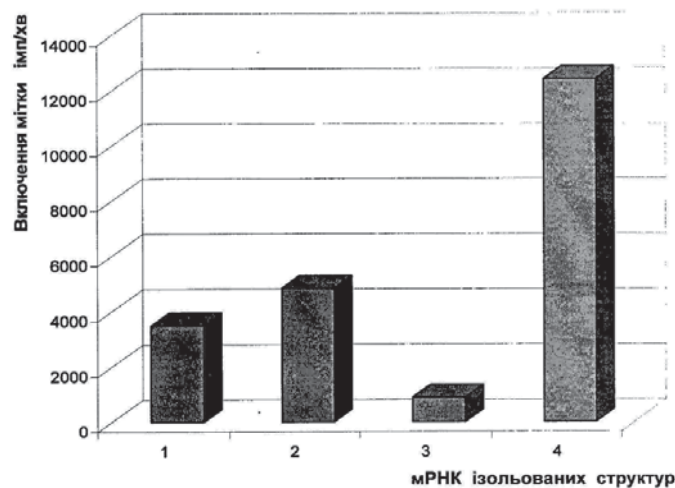


Рис. 3. Матрична активність мРНК ВККК із структур мРНП різної клітинної локалізації:

1. – мРНК із вільних полісомних мРНП;
2. – мРНК із мембранозв’язаних полісомних мРНП;
3. – мРНК із цитоплазматичних неполісомних мРНП;
4. – мРНК із мембранозв’язаних неполісомних мРНП.

Що стосується мРНП із мембранозв'язаних і вільних полісом, то вони містять РНК-залежну РНК-полімеразу і здійснюють *in vitro* синтез запрограмованих в мРНК білків. З літературних джерел відомо, що на вільних полісомних мРНП синтезуються білки нуклеокапсиду і мембранний білок, в той час як на мембранозв'язаних структурах синтезується G-білок рабдовірусів. Синтез глікопротеїдів на зв'язаних із мембранами полісомах має, очевидно, глибокий біологічний сенс, тому що посттрансляційні модифікації цих білків здійснюється в процесі транспорту цих білків з грубих мембран в гладенькі, а потім до плазматичної мембрани, де і здійснюється збирання вірусних часточок.

Матрична активність вільних цитоплазматичних неполісомних мРНП була самою низькою, хоча в кількісному співвідношенні ця структура превалює над всіма іншими видами мРНП. Це відповідає літературним даним відносно вірусу везикулярного стоматиту, згідно з якими майже вся (більш 90 %) функціональна інформаційна РНК міститься в мРНП, а інша частина знаходяться в полісомах [16].

З літературних джерел відомо, що вільні цитоплазматичні мРНП являють собою: а) заново синтезовану мРНК; б) надлишок мРНК після транскрипції, який не транслюється; в) запасні (масковані) мРНК, які транслюються тільки за певних фізіологічних умов. При цьому у складі вільних цитоплазматичних мРНП виявляється більша кількість білків, ніж в полісомних мРНП. Разом із тим достовірно встановлено, що функціональна роль РНК-зв'язаних білків зводиться до забезпечення стабільності структур, регуляції трансляції, а також для визначення субклітинної локалізації специфічних мРНП. При цьому слід зазначити, що мРНК може бути асоційована як з вірусними, так і з клітинними білками, не виключається також і можливість обміну білків мРНП з білками із цитоплазматичного фонду. Накопичені літературні дані про комплекси мРНП, в тому числі і ті, що виявлені в асоціації з рибосомами, вказують на те, що структура і склад таких рибонуклеїнових комплексів являються рухливою і динамічною [12, 17]. Можливо до складу вільних цитоплазматичних мРНП входять регуляторний білок (білки), які контролюють трансляцію мРНК. Також встановлено, що вільні цитоплазматичні і полісомозв'язані мРНП мають у своєму складі різний вміст білків, які фосфорилуються. Перехід вільних цитоплазматичних мРНП до полісомозв'язаних пов'язаний з дисоціацією фосфорильованих білків або з їх дефосфорильованням. Це вказує на те, що фосфорильовання (дефосфорильовання) білків мРНП залучується до контролю над процесами трансляції. Зміни в структурі і в складі мРНП-структур вказують на важливу та вирішальну роль, яку відіграють ці структури на різних етапах метаболізму мРНК та в процесах регуляції експресії генів [9, 17].

Отже, в результаті проведених досліджень в білок синтезуючій системі *in vitro* при використанні як матриць мРНП-структур різної клітинної локалізації, виділених із рослин, уражених ВККК, можна припустити, що синтез вірусних білків найбільш активно здійснюється на мембранозв'язаних неполісомних мРНП. Цей висновок впливає з отриманих нами даних, оскільки саме ці структури в системі трансляції *in vitro* здійснювали найбільш ефективне включення мітки в продукт синтезу. Можливо ці, зв'язані з мембраною структури мРНП, не мають репресора трансляції, що відрізняє їх від вільних цитоплазматичних неполісомних мРНП, які, якщо і мають РНК-репліказну активність, але в системі трансляції *in vitro* майже інертні. Їх функція в основному зводиться, мабуть, до транспорту генетичної інформації із клітини в клітину та запасу цієї інформації в клітині.

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

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

МАТРИЧНАЯ АКТИВНОСТЬ мРНП РАЗЛИЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ИЗ РАСТЕНИЙ, ИНФИЦИРОВАННЫХ МИНУС-ГЕНОМНЫМ ВИРУСОМ КУРЧАВОЙ КАРЛИКОВОСТИ КАРТОФЕЛЯ В БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЕ IN VITRO

Резюме

Используя структуры мРНП различной клеточной локализации, выделенных из растений, пораженных минус-геномным вирусом курчавой карликовости картофеля (ВККК), установлено, что синтез

вирусных белков *in vitro* осуществляется преимущественно на мембраносвязанных и свободных полисомных мРНК, которые способны направлять в бесклеточных белоксинтезирующих системах синтез запрограммированных в мРНК белков.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что синтез вирусных белков наиболее активно осуществляется на мембраносвязанных непполисомных мРНК – 23520 имп/мин. Аналогичное распределение матричной активности наблюдается и в том случае, когда в белоксинтезирующую систему вносилась мРНК, изолированная из мРНК различной клеточной локализации.

Наименьшая матричная активность наблюдалась в цитоплазматических непполисомных мРНК, которые мало активны в системе трансляции *in vitro* – всего 1890 имп/мин. Возможно, функция свободных цитоплазматических непполисомных мРНК сводится в основном, по-видимому, к транспорту и запасу генетической информации в клетке.

Ключевые слова: вирус курчавой карликовости картофеля (ВККК), мРНК, матричная активность.

N.I. Parkhomenko, L.F. Didenko, L.O. Maksymenko, N.S. Dyachenko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

MATRIX ACTIVITY OF mRNP OF DIFFERENT CELL LOCALIZATION FROM PLANTS INFECTED BY MINUS-GENOME CURLY POTATO DWARFNESS VIRUS IN PROTEIN-SYNTHESIZING SYSTEM IN VITRO

S u m m a r y

Using structures of mRNP of different cell localization isolated from plants infected by minus-genome curly potato dwarfness virus (CPDV), it was established that synthesis of virus proteins *in vitro* is mainly realized on membrane-related and free polysomal mRNP capable to direct synthesis of proteins programmed in RNA in cell-free protein-synthesizing systems.

The obtained results prove that synthesis of virus proteins is actively realized on membrane-related nonpoly-somal mRNP – 23520 imp/min. An analogous distribution of matrix activity is observed also in the case when mRNA isolated from mRNP of different cell localization was introduced in protein-synthesizing system.

The least matrix activity was observed in cytoplasmic nonpolysomal mRNPs which are low-active in the translation system *in vitro* – only 1890 imp/min. The function of free cytoplasmic nonpolysomal mRNP is apparently mainly reduced to the transport and reserve of genetic information in a cell.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: curly potato dwarfness virus (CPDV), mRNP, matrix activity.

The authors address: Parkhomenko N.I., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Диденко Л.Ф., Грабченко Н.И., Пархоменко Н.И., Максименко Л.А., Машковский Н.И., Краев В.Г. Исследование свободных и мембраносвязанных полисом из листьев дурмана, инфицированных Х-вирусом картофеля. //Микробиол. ж.-л. – 1989. – **51**, №4. – С. 32 – 36.
2. Диденко Л.Ф., Пархоменко Н.И., Максименко Л.А., Дяченко Н.С., Зарицкий Н.М., Козар Ф.Е. Влияние клинотатирования на вирус курчавой карликовости картофеля (ВККК) и его структурные компоненты *in vitro* и *in vivo*. // Космічна наука і технологія. – 1999. – **5**. – С. 1 – 5.
3. Максименко Л.А., Диденко Л.Ф., Пархоменко Н.И., Дяченко Н.С. Физико-химические свойства и функциональные особенности мРНК различной субклеточной локализации растений *Nicotiana rustica*, пораженных вирусом курчавой карликовости картофеля. //Микроб.журнал. – 2004. – **66**, №2 – С. 47 – 56.
4. Максименко Л.А., Краев В.Г., Диденко Л.Ф., Пархоменко Н.И., Козар Ф.Е., Зарицкий Н.М., Неборачко В.В. Исследование РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса курчавой карликовости картофеля // Тези доповідей. Мікроб.ж. – 1994. – **56**, N5. – С.90.
5. Пархоменко Н.И., Диденко Л.Ф., Максименко Л.А., Дяченко Н.С. Ферментативная активность нуклеокапсидных белков фиторабдовируса курчавой карликовости картофеля. // Мікроб.ж.-л. – 2004. – **66**, № 1. – С. 19 –28
6. Albertini A.A., Wernimont A.K., Muziol T. et al. Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein RNA complex. // Science. – 2006. – **313**. – P. 360 – 363.
7. Bag J., Sarkar S. Cytoplasmic nonpolysomal messenger ribonucleoprotein containing messenger RNA in chicken embryonic muscles // Biochem. – 1975. – **14**, N 7. – P. 3800 – 3807.
8. Chang, S.H., Hefti, E., Objieski, J.F., Bishop, D.L. RNA transcription by the virion polymerases of five rhabdoviruses. //Virology. – 1974. – **13**, N 4. – P. 652 – 661.

9. *Gupta A.K., Shaji D., Banerjee A.K.* Identification of a novel tripartite complex involved in replication of vesicular stomatitis virus genome RNA. // *J. Virol.* – 2003. – **77**, 4. – P. 732 – 738.
10. *Hove J.G., Hershey J.W.B.* Translational initiation factor and ribosome association with the cytoskeletal framework fraction from HeLa cells. // *Cell.* – 1984. – **37**, N 1. – P. 85 – 93.
11. *Kiselyova O.S., Yaminsky S.V., Karger T.V. et al.* Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein-RNA complexes formed in vitro. // *J. Gen. Virol.* – 2001. – **82**, N 6. – P. 1503 – 1508.
12. *Linder P.* The life of RNA with proteins. // *Science.* – 2004. – 304. – P. 694 – 695.
13. *Lucas W.J.* Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. // *Virol.* – 2006. – **344**, N1. – P. 169 – 184.
14. *Oanungo K.R., Shaji D., Mathur M., Banerjee A.R.* Two RNA polymerase complexes from vesicular stomatitis virus-infected cells that carry out transcription and replication of genome RNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2004. – **101**. – P. 5952 – 5957.
15. *Redinbaugh M.G., Hogenhout S.A.* Plant rhabdoviruses. // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2005. – **292**, 1. – P. 143 – 163.
16. *Rosen C.A., Ennis H.L., Cohen P.S.* Translational control of vesicular stomatitis virus protein synthesis. Isolation of an mRNA-sequestering particle. // *J. Virol.* – 1982. – **44**, N 3. – P. 932–938.
17. *Spirin A.S.* Eucaryotic messenger RNA and informosomes (omnia mea mecum porto). // *FEBS Lett.* – 1978. – **88**, N 1. – P. 15–17.
18. *Wagner J.D.O., Jackson A.O.* Characterization of the components and activity of sonchus yellow net rhabdovirus polymerase. // *J. Virol.* – 1997. – **71**, N 3. – P.2371–2382.
19. *Whelan S.P., Barr, J.N., Wertz, G.W.* Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. // *Curr.Top. Immunol.* – 2004. – **283**, N1. – P. 61–119.

Отримано 15.09.2010