

Функциональные особенности просом из листьев дурмана (*Datura stramonium*), пораженных X-вирусом картофеля

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

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 154

Низкомолекулярные РНП 19 S и 10 S способны угнетать синтез белков in vitro, направляемый геномной РНК X-вируса картофеля и информационными РНК полисом. Наиболее эффективным репрессором синтеза вирусспецифических белков в системе трансляции in vitro является РНК просом.

Введение. В составе свободных информосом выявлен новый класс субклеточных структур — низкомолекулярные РНП (просомы), которые могут сохранять мРНК в нетранслируемой форме [1, 2]. Исходя из того, что просомы, изолированные из клеток млекопитающих, репрессируют цитоплазматические специфические мРНК, можно предположить важную роль этой структуры в пост-транскрипционном контроле экспрессии гена. Мы не располагаем сведениями об ингибиторных функциях просом, выделенных из растительных клеток. Поэтому целью нашей работы было изучение ингибиторных функций просом, изолированной из *D. stramonium*, используя в качестве матриц геномную РНК ХВК, а также полисомы, изолированные из инфицированных ХВК растений дурмана, в системе трансляции *in vitro*.

Материалы и методы. Низкомолекулярные цитоплазматические РНП выделяли по методу [2] с некоторыми модификациями, описанными нами ранее [3]. РНК из просом и вирусные РНК выделяли по [4]. Электрофорез вирусных РНК проводили в 2,7 %-м ПААГ, как в работе [5]. Полисомы из растений дурмана, пораженных ХВК, изолировали по методу [6] и так же, как геномные вирусные РНК, использовали в качестве матриц в системе трансляции *in vitro*. Трансляцию осуществляли по рекомендациям Клеменса [7], используя

систему из лизата ретикулоцитов кролика, полученную следующим образом. Кролику ежедневно вводили подкожно по 2,5 мл ацетилфенилгидразина (10 мг/мл, рН 7,5) в течение четырех дней. Через 5 сут отбирали кровь и центрифугировали в бакет-роторе центрифуги К-70 при 1200 g в течение 10 мин при 4 °С. Осажденные клетки ресуспендировали в буфере, приготовленном на стерильной деионизированной воде и содержащем 140 мМ NaCl (осч), 5 мМ KCl (осч), 5 мМ Mg-ацетат («Merck», Германия), 5 мМ глюкоза, 5 мМ HEPES («Serva», Германия), рН 7,2. Клетки осаждали при 2000 g в течение 10 мин в бакет-роторе на холоду. Этап отмывания клеток вышеуказанным буфером повторяли дважды. После завершающего центрифугирования измеряли объем осажденных клеток и лизировали их, добавив равный объем холодного бидистиллята. Лизат центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин.

Для снижения матричной активности эндогенных мРНК лизат перед использованием обрабатывали микрококковой нуклеазой. Для этого к лизату добавляли растворы CaCl₂ и гемаина до конечной концентрации 1 мМ и 40 мкМ соответственно. Затем добавляли микрококковую нуклеазу («Boehringer Mannheim», Германия) до концентрации 75 ед/мл и инкубировали 15 мин при 20 °С. Для блокирования действия нуклеазы добавляли 0,1 М ЭГТА, рН 7,0, до конечной концентрации 2 мМ. Проба объемом 50 мкл инкубационной смеси содер-

жала 20 мМ Hepes, рН 7,6 («Serva»); 120 мМ К-ацетат, 3 мМ Mg-ацетат («Merck»); 1 мМ АТФ, 20 мкМ ГТФ, 8 мМ креатин-фосфат, 2 мкг/мл креатинфосфокиназы, 2 мМ дитиотреитол, 40 мкМ спермидин («Serva»); 0,12 мМ смесь аминокислот без метионина («Amersham», Великобритания); 15 мкКи ³⁵S-меченного метионина, 3 мкг тРНК из зародышей пшеницы («Sigma», США), 20 мкл лизата ретикулоцитов кролика, 4 мкг мРНК. Просомы и РНК просом в концентрациях 0,001, 0,01 и 0,1 о. е. преинкубировали с матрицей в течение 15 мин и вносили в систему трансляции *in vitro*. Смесь инкубировали при 30 °С в течение 90 мин. Для анализа включения метки в синтезируемый белок из каждой пробы отбирали по 5 мкл смеси и наносили на бумажные фильтры («Whatman» 3 ММ). После высушивания фильтры помещали на 10 мин в раствор, состоящий из 80 мл ацетона и 10 мл 50 %-й ТХУ. Затем переносили в 10 %-й горячий раствор ТХУ и инкубировали в течение 3 мин, после этого отмывали четыре раза по 3 мин 5 %-й ТХУ. И, наконец, споласкивали 96° этанолом в течение 3 мин. Фильтры высушивали, помещали в сцинтилляционную жидкость и просчитывали количество импульсов за 1 мин при помощи сцинтилляционного счетчика «Beckman LS-7800» (США).

Продукты трансляции анализировали методом электрофореза в градиентном 8—20 %-м ПААГ по Лэмбли [8]. В качестве маркеров использовали стандартную смесь белков фирмы «Pharmacia» (Швеция): фосфоорилаза — 94000; альбумин — 67000; овальбумин — 43000; карбоник-ангидраза — 30000; трипсин-ингибитор — 20100; лактальбумин — 14400 Да. Гель высушивали на «Whatman» 3 ММ и экспонировали на рентгеновской пленке РМ-1.

Результаты и обсуждение. Из литературы известно, что в свободных цитоплазматических рибонуклеопротеидах содержится репрессор трансляции [1]. Свободные цитоплазматические информосома — нетранслируемые структуры клетки, поэтому вызывает несомненный интерес выяснение того, какой именно структурный компонент свободных мРНК играет главную роль в репрессии трансляции. Для выяснения функциональной роли просом в регуляции экспрессии вирусного гена в системе трансляции *in vitro* мы исследовали действие низкомолекулярного РНП и его РНК на матричную активность геномной РНК X-вируса картофеля, мРНК в составе полисом растений дурмана, пораженных ХВК.

На рис. 1 приведены УФ-спектры геномной РНК ХВК, РНК просом, а также полисом, исполь-

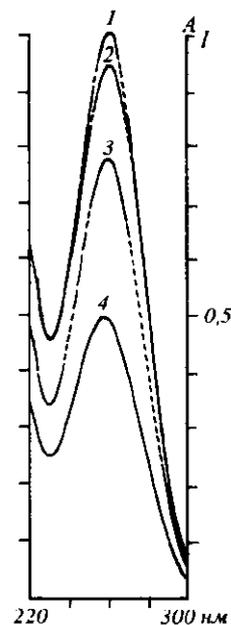


Рис. 1. УФ-спектры: 1 — РНК X-вируса картофеля (ХВК); 2 — РНК вируса табачной мозаики; 3 — РНК просом, выделенных из информосом листьев дурмана, пораженных ХВК; 4 — полисомы, выделенные из листьев дурмана, пораженных ХВК

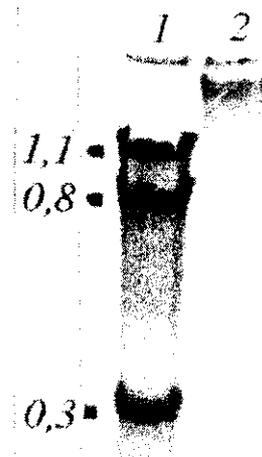


Рис. 2. Электрофореграмма РНК в 2,7 %-м ПААГ: 1 — РНК вируса мозаики костра (маркер); 2 — РНК ХВК

зуемых нами в системе трансляции *in vitro*. Свидетельством чистоты РНК служат соотношения оптической плотности при длинах волн 260:280 и 260:230 нм, которые имели значение соответственно 2,2 и 2,1.

На рис. 2 показан результат электрофоретического анализа РНК ХВК. Как видно, РНК ХВК представляет собой целостную структуру с молекулярной массой 2 МДа, что дает основание исполь-

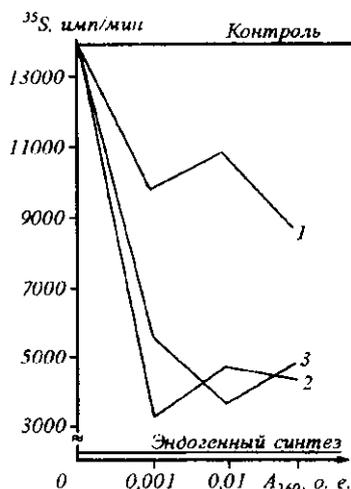


Рис. 3. Влияние просом и их РНК на матричную активность геномной РНК ХВК в системе трансляции *in vitro*: контроль — РНК ХВК; 1 — РНК ХВК + просомы 10 S; 2 — РНК ХВК + РНК просом 10 S; 3 — РНК ХВК + РНК просом 19 S

зовать ее в качестве матрицы в системе трансляции *in vitro*.

В результате проведенных исследований выяснилось, что и низкомолекулярный РНП, и его РНК ингибировали синтез белков *in vitro*, направляемый вирусспецифическими матрицами. Однако РНП 10 S в системе *in vitro* в меньшей степени снижал матричную активность геномной РНК ХВК в сравнении с его РНК (рис. 3). Наиболее эффективно ингибиторные свойства просом проявлялись при добавлении их в систему трансляции в концентрации 0,1 о. е., хотя при внесении в систему трансляции *in vitro* РНК просом 10 S ингибирующий эффект проявлялся при концентрации низкомолекулярной РНК 0,001 о. е. В этом случае синтез белков в системе ингибировался на 75 %. Но при увеличении содержания в системе трансляции просом и просомной РНК до 0,01 о. е. уровень синтеза белка несколько повышался.

Однако при использовании РНК из РНП 19 S самым сильным ингибитором была РНК просом в концентрации 0,01 о. е. (синтез белков снижался на 72 %). Та же тенденция прослеживалась и в том случае, когда в качестве матрицы использовали полисомы растений дурмана, пораженных ХВК. Низкомолекулярный РНП незначительно снижал уровень синтеза белков, запрограммированных в мРНК полисом. При этом присутствие в белоксинтезирующей системе РНК из 10 S и 19 S структур способствовало снижению включения метки в синтезируемый продукт более чем на 50 % (рис. 4).

Геномная РНК ХВК имеет пять открытых рамок считывания, соответствующих (начиная с 5'-конца) полипептидам с молекулярными массами 166, 25, 12, 8 и 25 кДа. 3'-концевая открытая рамка считывания соответствует белку оболочки ХВК [9]. Однако в бесклеточной системе *in vitro* транслируются, в основном, высокомолекулярные полипептиды 110 кДа [10], 145 и 180 кДа [11] и не транслируется белок оболочки.

В инфицированных ХВК растениях выявлены субгеномные РНК, кодирующие вышеупомянутые полипептиды [12, 13]. Субгеномная РНК белка оболочки ХВК обнаружена в составе свободных и мембраносвязанных полисом, что подтверждено трансляцией мРНК *in vitro* и результатами иммуноблоттинга продуктов трансляции [14].

Авторадиография продуктов трансляции геномной РНК ХВК подтвердила, что присутствие в системе трансляции РНК просом в большей мере снижает синтез белков по сравнению с просомой (рис. 5). В частности, ингибируется синтез высокомолекулярного полипептида 143 кДа, который, как показано нами ранее, является РНК-зависимой-РНК-полимеразой [15]. При использовании геномной РНК ХВК в качестве матрицы в системе трансляции не отмечено синтеза структурного вирусного белка, что соответствует особой структурной организации вирусного генома. Однако при использовании в качестве матрицы в белоксинтезирующей системе *in vitro* полисом, выделенных из пораженных ХВК растений, наряду с высокомолекулярным белком, соответствующим РНК-полимеразе, наблюдается и синтез структурного вирусного белка. Это означает, что в составе полисом инфицированных клеток, как показано нами ранее [14], выявляются и короткие полисомы, имеющие моно-

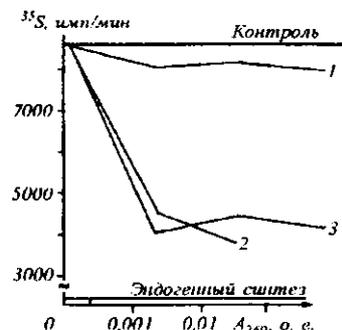


Рис. 4. Влияние просом и их РНК на матричную активность полисом растений дурмана, пораженных ХВК в системе трансляции *in vitro*: контроль — полисомы; 1 — полисомы + просомы 10 S; 2 — полисомы + РНК просом 10 S; 3 — полисомы + РНК просом 19 S

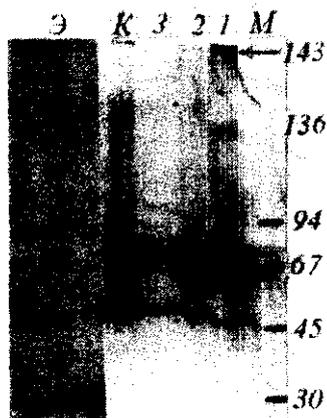


Рис. 5. Влияние просом и их РНК на матричную активность РНК ХВК в системе трансляции *in vitro* (авторадиография продуктов трансляции): К — синтез белков, направляемых РНК ХВК; Э — эндогенный синтез; 1 — РНК ХВК + просомы 10 S; 2 — РНК ХВК + РНК просом 10 S; 3 — РНК ХВК + РНК просом 19 S

Рис. 6. Влияние просом и их РНК на матричную активность полисом в системе трансляции *in vitro* (авторадиография продуктов трансляции): К — синтез белков, направляемый полисомами из растений дурмана, пораженных ХВК; Э — эндогенный синтез; 1 — полисомы + просомы 10 S; 2 — полисомы + РНК просом 10 S; 3 — полисомы + РНК просом 19 S

цистронную матрицу гена структурного вирусного белка (рис. 6).

Присутствие в системе трансляции РНК из просом 10 S в значительной степени угнетает синтез структурного белка (28 кДа), а РНК из просом 19 S полностью блокирует его синтез. Исходя из автографа можно отметить, что несколько снижается и синтез высокомолекулярного белка 143 кДа (см. рис. 6).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что низкомолекулярный РНП угнетает синтез белков *in vitro*, направляемый геномной РНК ХВК и информационными РНК в составе полисом, выделенных из растений дурмана, пораженных ХВК. Ингибирующий эффект зависит от концентрации просом, вносимых в систему трансляции. РНК просом в большей степени ингибирует синтез белков в сравнении со структурами РНП.

Ранее установлено, что просомы 10 S и 19 S и выделенные из них РНК 4 S (70—90 нуклеотидов) репрессируют различные мРНК клеточного и вирусного происхождения [16, 17]. Так, РНК просом специфически подавляет трансляцию мРНК аденовируса и вирионной РНК вирусов табачной мозаики и мозаики вигны [16]. Предполагается, что РНП и выделенная из него РНК не влияют на стадию элонгации, но ингибируют стадию присоединения 60 S субъединицы рибосом к 43 S преинициаторному комплексу [17].

Кроме того, обнаружена способность просомной РНК 4 S гибридизоваться с вирусспецифическими мРНК [18], что является, по-видимому, одним из определяющих факторов для необходимости выяснения механизма ингибирования мРНК на уровне трансляции.

Нами установлено, что низкомолекулярные РНП (просомы) 19S и 10S, выделенные из растений *D. stramonium*, и их РНК ингибируют синтез белков *in vitro*, направляемый РНК ХВК и мРНК полисом, изолированных из листьев дурмана, пораженных ХВК. РНК просом в большей степени угнетала синтез белка в системе *in vitro*. Ингибирующий эффект зависит от концентрации содержащихся в системе трансляции просом и их РНК. Механизм участия просом в регуляции экспрессии гена на трансляционном уровне еще не изучен и является предметом наших дальнейших исследований.

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

Функциональні особливості просом із листя дурману (*Datura stramonium*), уражених Х-вірусом картоплі

Резюме

Низькомолекулярні РНП 19 і 10 S здатні пригнічувати синтез білків *in vitro*, направляемий геномними РНК Х-вірусу картоплі, та інформаційними РНК полісом. Однак найефективнішим репресором трансляції *in vitro* є РНК просом.

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

Functional peculiarities of the prosomes of leaves *Datura stramonium* infected by potato virus X

Summary

Low-molecular RNP of 19 S and 10 S are able to suppress protein synthesis in vitro, directed by potato virus X genome RNA and information RNA of polysomes. Though the most effective repressor of virus-specific proteins synthesis in system of translation in vitro is RNA of prosomes.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Civelli O., Vincent A., Maundrell K. et al. The translation repression of globin mRNA in free cytoplasmic ribonucleo-protein complexes // Eur. Biochem.—1980.—107, N 2.—P. 577—585.
2. Schmid H. P., Akhayat O., De Sa C. M. et al. The prosome: an ubiquitous morphologically distinct RNP particle associated with repressed mRNA as containing specific Sc RNA and characteristic set of proteins // The EMBO J.—1984.—3, N 1—P. 29—34.
3. Пархоменко Н. И., Диденко Л. Ф., Максименко Л. А. Физико-химические свойства просом листьев дурмана, пораженных X-вирусом картофеля // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 6.—С. 102—111.
4. Steele K. P., Frist R. N. Characterisation of the 3'-termini of the RNA of Cowpea Mosaic Virus // J. Virol.—1983.—26, N 2.—P. 243—248.
5. Peacock C., Dingman C. W. Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis // Biochemistry.—1967.—6.—P. 1818—1827.
6. Jackson A. O., Larkins B. A. Influence of ionic strength, pH and chelating of divalent metals on isolation of polyribosomes from tobacco leaves // Plant Physiol.—1976.—57.—P. 5—10.
7. Клеменс М. Трансляция эукариотических матричных РНК в бесклеточных экстрактах // Транскрипция и трансляция / Под ред. Хеймса, Хиггинса.—М.: Мир, 1987.—С. 277—325.
8. Laemmli V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.—P. 680—685.

9. Huisman M. J., Linthorst H. J. M., Bol J. F., Cornelissen B. J. C. The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses // J. Gen. Virol.—1988.—69, N 8.—P. 1789—1798.
10. Ricciardi R. P., Goodman R. M., Gottlieb D. Translation of PVX RNA in vitro by wheat germ. 1. Characterization of the reaction and product size // Virology.—1978.—85, N 1.—P. 310—314.
11. Wodnar-Filipowicz A., Skrzeczkowski L. J., Filipowicz W. Translation of potato virus X RNA into high molecular weight proteins // FEBS Lett.—1980.—109, N 1.—P. 151—155.
12. Грама Д. П., Машковский Н. Н. Выявление и исследование субгеномной РНК X-вируса картофеля // Биополимеры и клетка.—1986.—2, № 6.—С. 328—334.
13. Dolja V. V., Grama D. P., Morozov S. Yu., Atabekov J. G. Potato virus X-related single- and double-stranded RNAs. Characterization and identification of terminal structures // FEBS Lett.—1987.—214.—P. 308—312.
14. Диденко Л. Ф., Грабченко Н. И., Пархоменко Н. И. и др. Исследование свободных и мембраносвязанных полисом из листьев дурмана, инфицированных X-вирусом картофеля // Микробиол. журн.—1989.—51, № 4.—С. 32—36.
15. Диденко Л. Ф., Максименко Л. А., Пархоменко Н. И. Фосфорилирование белков информосом из листьев дурмана, инфицированных X-вирусом картофеля // Там же.—1993.—55, № 2.—С. 68—74.
16. Sarkar S., Mukherjee A. K., Guha C. A ribonuclease-resistant cytoplasmic 10 S ribonucleoprotein of chick embryonic muscle a potent inhibition of cell-free protein synthesis // J. Biol. Chem.—1981.—256, N 10.—P. 5077—5086.
17. Horsh A., Kohler J., Schmid H. P. Prosome are involved in the repression of viral mRNA // Z. Naturforsch.—1985.—40, N 5—6.—P. 449—450.
18. Sarkar S., Stedman H., Javabaskarar C. et al. Translational control by a cytoplasmic RNP particle of chick embryonic muscle implications for a function as antimessenger RNA // Trans. contr. Meet. (Banbury, Nov. 1985).—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1986.—P. 150—157.

УДК 577.217

Поступила в редакцию 28.02.96