

## ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 578.226

ИЗУЧЕНИЕ СИГНАЛА СБОРКИ ВИРУСНЫХ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДОВ  
У ПОТЕКСВИРУСОВЕ.К. Петрова\*, Е.А. Трифонова, Н.А. Никитин, О.А. Кондакова,  
И.Г. Атабеков, О.В. Карпова

Кафедра вирусологии, биологический факультет,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
\* e-mail: petrova@mail.bio.msu.ru

Изучено образование вирусных рибонуклеопротеидов при инкубации 5'-концевых транскриптов вируса мозаики альтернантеры с белком оболочки X-вируса картофеля (представители рода *Potexvirus*). Показано, что кэпирование транскриптов вируса мозаики альтернантеры оказывает влияние на эффективность их взаимодействия с белком оболочки. При этом удаление кэп-структуры у предварительно кэпированных транскриптов вируса мозаики альтернантеры не препятствует сборке вирусных рибонуклеопротеидов. Удаление первых 100 нуклеотидов (вероятного участка инициации сборки) не оказало влияния на формирование вирусных рибонуклеопротеидов. Получены дополнительные доказательства того, что сборка вирусных рибонуклеопротеидов у потексвирусов не зависит от нуклеотидной последовательности РНК.

**Ключевые слова:** вирусы растений, вирус мозаики альтернантеры, X-вирус картофеля, вирусный рибонуклеопротеид, сборка вириона, кэп-структура.

Сборка вириона является одним из основных этапов инфекционного цикла вирусов различной природы. Однако специфический сигнал упаковки (участок инициации сборки) до сих пор не охарактеризован для большинства вирусов растений со спиральной структурой. Изучение сборки вирионов и вирусных рибонуклеопротеидов (ВРНП) и поиск сигналов упаковки вирусных геномов является актуальным и важным для понимания процессов образования вирусной частицы и механизмов взаимодействия вирусных белка оболочки (БО) и РНК. Ранее в нашей лаборатории было продемонстрировано, что БО спирального X-вируса картофеля (ХВК) (род *Potexvirus*, семейство *Alfalflexiviridae*) способен *in vitro* образовывать ВРНП не только с РНК ХВК, но и с гетерологичными нуклеиновыми кислотами [1, 2]. Образующиеся ВРНП морфологически и по трансляционным свойствам идентичны гомологичным ВРНП (РНК ХВК — БО ХВК) и нативным вирионам ХВК. Было обнаружено, что инициация сборки гетерологичных ВРНП (чужеродная РНК — БО ХВК) *in vitro* так же, как и гомологичных, начинается с 5'-конца молекулы РНК и не зависит от специфической нуклеотидной последовательности. Показано, что 5'-концевые некэпированные транскрипты РНК ХВК не образуют ВРНП при инкубации с БО ХВК *in vitro*. При этом инкубация БО ХВК с кэпированными транскриптами потексвирусов приводит к формированию ВРНП, идентичных по структуре и свойствам гомологичным ВРНП и нативным вирионам

ХВК. Таким образом, важным условием сборки ВРНП *in vitro* является предварительное кэпирование нуклеиновой кислоты. Однако удаление кэп-структуры после предварительного кэпирования РНК в дальнейшем не препятствует образованию ВРНП. Было высказано предположение, что кэп-структура не является сигналом сборки сама по себе, но влияет на 5'-конец молекулы РНК, создавая конформационный сигнал упаковки и способствуя эффективному взаимодействию РНК и БО ХВК [3, 4].

В настоящей работе влияние кэп-структуры на эффективность сборки ВРНП было изучено на примере другого вируса, относящегося к роду *Potexvirus* — вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт). Геном ВМАльт представлен одноцепочечной (+) РНК длиной 6606 нуклеотидов, несущей на 5'-конце кэп-структуру, а на 3'-конце поли(А)-последовательность. РНК ВМАльт содержит пять открытых рамок трансляции (ОРТ): 5'-проксимальная ОРТ транслируется непосредственно с геномной РНК с образованием вирусной репликазы. ОРТ 2, 3, 4 представляют собой характерный для потексвирусов так называемый "тройной блок генов", кодирующий три транспортных белка. Продукт ОРТ 5 — белок оболочки с молекулярной массой 22 кДа [5].

Специфический сигнал упаковки для ВМАльт на данный момент неизвестен. Данные по подавлению трансляции РНК в составе ВРНП свидетельствуют о том, что в случае ВМАльт участок инициа-

ции сборки также находится на 5'-конце молекулы РНК [6, 7].

Показано, что БО ВМАльт в отсутствие РНК способен полимеризоваться *in vitro* в различных условиях с образованием вирусоподобных частиц (ВПЧ), сходных по своей морфологии с нативными вирионами или вРНП. Это затрудняет анализ сборки вРНП при инкубации 5'-концевых транскриптов ВМАльт с БО ВМАльт, поэтому было принято решение исследовать сборку вРНП при инкубации транскриптов с БО ХВК, который не полимеризуется в отсутствие РНК [3, 8].

### Материалы и методы

Препарат ВМАльт (штамм AltMV-MU, номер FJ822136 в системе GenBank [9]) выделяли из зараженных растений портулака (*Portulaca grandiflora*) согласно [6]. Белок оболочки ХВК получали методом солевой депротенинизации, РНК выделяли фенольным методом [6].

Для получения вРНП *in vitro* смешивали РНК и белок оболочки и проводили инкубацию в стандартных условиях (в 20 мкл 0,01 М Трис-НСI-буфера рН 7,5 при комнатной температуре в течение 20 мин) [2].

Образцы для электронной микроскопии были приготовлены согласно [2, 3], анализ проводили с помощью электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Япония).

Образцы для атомно-силовой микроскопии были приготовлены и проанализированы, как описано ранее [3].

Генно-инженерные конструкции и транскрипты были получены, как описано в [3]. кДНК для получения 5'-концевого транскрипта ВМАльт, соответствующего с 1-й по 1320-й нт 5'-концу РНК ВМАльт, была получена методом ПЦР на матрице плазмиды AltMV-19 (копия 1-1639 нт ВМАльт (штамм AltMV-MU) под контролем Т7 промотора в плазмиде рBluescript SK (+) с использованием следующих пар праймеров: AltMV1-ApaI-fw (5'-ccggggcccgaaagtaagcaagcaaaaca-3') и AltMV1320-PstI-rev (5'-ccgctgcagtaggacagtgacacgtcaac-3'). кДНК для получения делеционного 5'-концевого транскрипта ВМАльт, соответствующего с 97-го по 1639-й нт 5'-концу РНК ВМАльт, была получена методом ПЦР на матрице плазмиды AltMV-19 (копия 1-3944 нт РНК ХВК под Т7 промотором в рSL1180 (Amp<sup>R</sup>)) с использованием следующей пары праймеров: Т7-AltMV-del96-XhoI (5'-cagctctcagtaatacagactcactatagggccacttcttcggttc-3') и AltMV-R0-NotI-m (5'-agacttcgcccggccgctgtgtat-3'). Для получения конструкции ВМАльт-1320 (1-1320 нт РНК ВМАльт) продукты ПЦР амплификации были клонированы в плазмиду рGEM5Zf(+) по сайтам рестрикции AраI и PstI. Для получения конструкции ВМАльтΔ (97-1639 нт РНК ВМАльт) продукты ПЦР амплификации были клонированы

в плазмиду рSL1180 (Amp<sup>R</sup>) путем двойной вставки в одно клонирование: вектор — рSL1180 (рестрикция по сайтам Xho I и Pst I); вставка-1 — ПЦР-продукт (97-303 нт ВМАльт) (рестрикция по сайтам Xho I и Not I); вставка-2 — AltMV-19 (303-1639 нт ВМАльт) (рестрикция по сайтам Not I и Pst I). Все вставки находились под контролем промотора бактериофага Т7 *E.coli*. Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* штамма XL1.

Реакцию транскрипции проводили *in vitro* с применением реактивов и ферментов (Т7-РНК-полимераза) фирмы "Promega" (США).

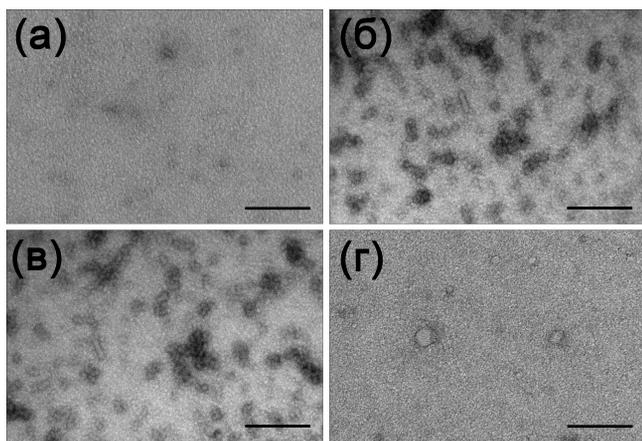
Кэпирование транскриптов *in vitro* проводилось с использованием набора "ScriptCap m<sup>7</sup>G Capping System" фирмы EPICENTRE Biotechnologies (США) согласно протоколу производителя.

Декэпирование предварительно кэпированных транскриптов проводилось с использованием кислой пирофосфатазы табака (ТАР) фирмы EPICENTRE Biotechnologies (США) по стандартному протоколу производителя.

### Результаты и обсуждение

Ранее в нашей лаборатории было показано, что БО ВМАльт способен к образованию протяженных вирусоподобных частиц в отсутствие РНК в различных условиях [7]. Такая полимеризация БО ВМАльт затрудняет анализ формирования вРНП при инкубации БО ВМАльт с 5'-концевыми транскриптами РНК ВМАльт. В то же время было выявлено, что РНК ВМАльт эффективно взаимодействует с БО ХВК с образованием вРНП, по размерам и структуре идентичных гомологичным вРНП и нативным вирионам ХВК [2]. Поэтому для изучения влияния кэп-структуры и нуклеотидной последовательности 5'-конца РНК ВМАльт РНК (или транскрипт) ВМАльт инкубировали с БО ХВК.

Полученный *in vitro* некэпированный транскрипт ВМАльт, соответствующий с 1-го по 1320-й нуклеотид 5'-концу геномной РНК ВМАльт (ВМАльт-1320), инкубировали с БО ХВК. Методом ПЭМ (негативное контрастирование) показано, что образования вРНП при этом не происходит (рис. 1а). В качестве отрицательного контроля использовали БО ХВК, проинкубированный в условиях формирования вРНП в отсутствие РНК (рис. 1г). Транскрипт ВМАльт-1320 был кэпирован с помощью кэпирующей системы вируса осповакцины, и часть кэпированного транскрипта ВМАльт-1320 была проинкубирована с БО ХВК, что привело к формированию вРНП (рис. 1б). Другая часть препарата кэпированного транскрипта ВМАльт-1320 была обработана кислой пирофосфатазой табака (ТАР) с целью удаления кэп-структуры с 5'-конца транскрипта. Декэпирование предварительно кэпированного транскрипта ВМАльт-1320 не повлияло на сборку — при его инкубации с БО ХВК было

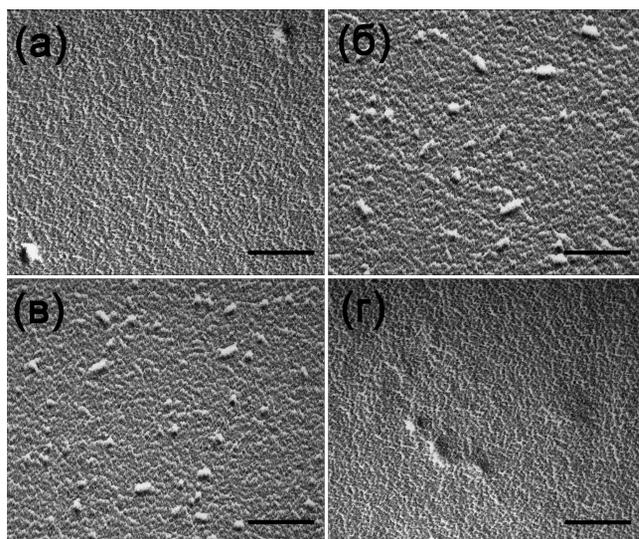


**Рис. 1.** Анализ образования вирусных рибонуклеопротеидов при инкубации транскриптов ВМАльт-1320 с БО ХВК *in vitro*. а — Некэпированный транскрипт ВМАльт-1320; б — Кэпированный транскрипт ВМАльт-1320; в — Кэпированный транскрипт ВМАльт-1320, обработанный ТАР; г — БО в отсутствие РНК. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование 2% уранилацетатом. Метка 200 нм.

зафиксировано образование частиц (рис. 1в), сходных по морфологии с частицами на рис. 1б. Таким образом, кэп-структура влияет на образование конформационного сигнала упаковки и формирование ВРНП у 5'-концевых транскриптов геномной РНК другого представителя группы потесквирусов — ВМАльт — так же, как это было показано для ХВК [3, 4]. При использованных условиях получения ВРНП количества БО в инкубационной смеси недостаточно для полной упаковки транскриптов в нитевидные частицы, сборка происходит не полностью [2]. Длина полученных ВРНП пропорциональна длине РНК, входящей в их состав [2–4], поэтому ВРНП, образующиеся при инкубации с БО ХВК коротких транскриптов, выглядят как короткие палочки.

В отличие от РНК ВМАльт для его близкого родственника — вируса мозаики папайи (ВМППа), с которым ВМАльт имеет идентичность нуклеотидных последовательностей на уровне 79,8 % — в экспериментах, проведенных *in vitro*, участок начала сборки был точно локализован как первые 47 нуклеотидов на 5'-конце РНК ВМППа [10, 11]. Можно было ожидать, что участок начала сборки у ВМАльт будет расположен там же, где у ВМППа. В связи с этим, помимо кэпированных и декэпированных транскриптов, был получен 5'-концевой транскрипт ВМАльт с делецией первых 96 нт (ВМАльтΔ), которые включают в себя сигнал упаковки ВМППа. ВМАльтΔ длиной 1542 нуклеотида соответствовал с 97-го по 1639-й нуклеотид 5'-конца молекулы РНК ВМАльт.

Методами ПЭМ и атомно-силовой микроскопии (АСМ) были проанализированы частицы, образующиеся при инкубации БО ХВК с некэпированными, кэпированными и декэпированными транскриптами ВМАльтΔ. На рис. 2 представлены

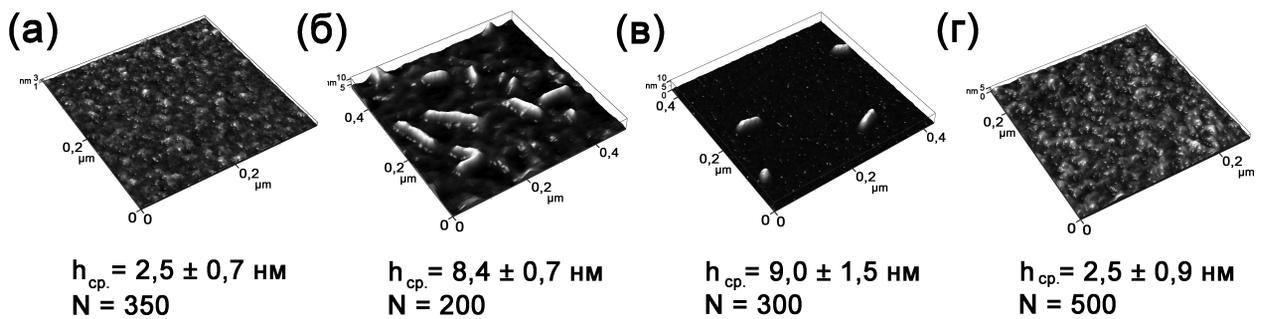


**Рис. 2.** Анализ образования вирусных рибонуклеопротеидов при инкубации транскриптов ВМАльтΔ с БО ХВК *in vitro*. а — Некэпированный транскрипт ВМАльтΔ; б — Кэпированный транскрипт ВМАльтΔ; в — Кэпированный транскрипт ВМАльтΔ, обработанный ТАР; г — БО в отсутствие РНК. Электронные микрофотографии, угловое отклонение металлом (Pt+Pd, 7°). Метка 200 нм

результаты анализа с помощью ПЭМ (угловое напыление). Инкубация некэпированного транскрипта ВМАльтΔ с БО ХВК не приводит к образованию частиц (рис. 2а). Полученный результат не вызывает удивления, так как в транскрипте был удален участок, который, как мы предполагали, содержал участок инициации сборки по аналогии с ВМППа. Однако при кэпировании данного транскрипта и его последующей инкубации с БО ХВК было зафиксировано формирование ВРНП (рис. 2б). Полученный результат свидетельствует о том, что последовательность первых 96 нуклеотидов не содержит сигнала сборки ВРНП для ВМАльт.

Декэпирование ранее кэпированных транскриптов ВМАльтΔ также не препятствует образованию ВРНП (рис. 2в). В качестве отрицательного контроля был использован свободный БО ХВК, проинкубированный в стандартных условиях сборки (рис. 2г).

Эти данные были подтверждены методом АСМ, который показал отсутствие сборки в случае некэпированного транскрипта ВМАльтΔ (рис. 3а) и образование частиц в случае инкубации с БО ХВК кэпированного (рис. 3б) или декэпированного транскрипта ВМАльтΔ (рис. 3в). Метод АСМ позволяет измерить высоту полученных частиц. При инкубации кэпированных и декэпированных транскриптов ВМАльтΔ с БО ХВК были образованы частицы со средними высотами  $8,4 \pm 0,7$  и  $9,0 \pm 1,5$  нм соответственно (рис. 3б, в). Высота полученных частиц сопоставима со средней высотой ВРНП, образованных при инкубации геномной РНК ВМАльт с БО ХВК, что свидетельствует о схожей морфологии частиц [2]. При инкубации БО ХВК с некэпи-



**Рис. 3.** Анализ методом атомно-силовой микроскопии образования вРНП при инкубации транскриптов РНК ВМАльтΔ с БО ХВК *in vitro*. а — Транскрипт ВМАльтΔ; б — Кэпированный транскрипт ВМАльтΔ; в — Кэпированный транскрипт ВМАльтΔ, обработанный ТАР; г — БО в отсутствие РНК. Указаны высоты образованных структур ( $h_{cp}$ ) и число измеренных частиц (N)

рованными транскриптами ВМАльтΔ или без РНК средние высоты агрегатов составили  $2,5 \pm 0,7$  и  $2,5 \pm 0,9$  нм соответственно (рис. 3а, г).

На основании представленных результатов можно сделать вывод, что 5'-концевые транскрипты ВМАльт взаимодействуют с БО ХВК аналогично 5'-концевым транскриптам ХВК [3, 4]: при инкубации с БО ХВК некэпированных транскриптов ВМАльт образование вРНП зафиксировать не удалось. При инкубации с БО кэпированных транскриптов ВМАльт частицы образуются, а удаление кэп-структуры не препятствует сборке — вРНП формируются при инкубации декэпированных транскриптов ВМАльт с БО ХВК. Делеция возможного сайта инициации сборки по аналогии с ВМПап не повлияла на результаты: некэпированные транскрипты ВМАльтΔ не одевались белком оболочки ХВК. Однако после кэпирования делеционных мутантов происходило образование вРНП. Таким образом, можно заключить, что кэпирование оказывает существенное влияние на процесс формирования вРНП и в случае образования вРНП при инкубации БО с 5'-концевыми транскриптами геномной РНК другого потексвируса — ВМАльт. Данные, полученные в экспериментах с транскриптами ВМАльтΔ, позволяют предположить, что либо участок начала сборки ВМАльт отличается от участка начала сборки ВМПап, либо для ВМАльт, как и для ХВК, образование вРНП не зависит от нуклеотидной последовательности РНК [2, 6].

Скорее всего, кэп не является сигналом упаковки или местом инициации сборки вРНП сам по себе, так как при этом *in vivo* могла бы происходить упаковка не только вирусных РНК, но и клеточных мРНК. Однако существует вероятность, что он оказывает влияние на структуру 5'-конца вирусной РНК потексвируса, образуя конформационный сигнал упаковки, который узнаёт вирусный БО при сборке вРНП.

Таким образом, кэпирование 5'-концевых транскриптов ВМАльт оказывает влияние на эффективность их взаимодействия с БО ХВК. Удаление кэп-структуры у предварительно кэпированных транскриптов ВМАльт аналогично удалению кэп-структуры у транскриптов ХВК не приводит к подавлению процесса формирования вРНП при инкубации с БО ХВК. Получены дополнительные доказательства того, что сборка вРНП у потексвируса не зависит от нуклеотидной последовательности РНК [2–4]. Можно предположить, что кэпирование изменяет структуру 5'-конца РНК потексвируса и влияет на образование конформационного сигнала упаковки, способствуя эффективному связыванию БО и вирусной РНК и образованию вирусной частицы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00007). Авторы выражают благодарность М.Н. Савватееву за помощь в анализе образцов методом атомно-силовой микроскопии.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Новиков В.К., Кимаев В.З., Атабеков И.Г. Реконструкция рибонуклеопротеида вируса X картофеля // Докл. РАН. 1972. Т. 204. № 5. С. 1259–1262.
- Архипенко М.В., Петрова Е.К., Никитин Н.А., Протопопова А.Д., Дубровин Е.В., Яминский И.В., Родионова Н.П., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Искусственные вирусоподобные частицы, полученные *in vitro* из белка оболочки X-вируса картофеля и чужеродных вирусных РНК // Acta naturae. 2011. Т. 3. № 3 (10). С. 42–48.
- Petrova E., Nikitin N., Protopyova A., Arkhipenko M., Yaminskii I., Karpova O., Atabekov J. The role of the 5' cap structure in viral ribonucleoproteins assembly from Potato Virus X coat protein and RNAs // Biochimie. 2013. Vol. 95. N 12. P. 2415–2422.
- Petrova E.K., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Protopyova A.D., Karpova O.V., Atabekov J.G. The 5'-proximal region of Potato virus X RNA involves the potential cap-dependent "conformational element" for encapsidation // Biochimie. 2015. Vol. 115. P. 116–119.
- Hammond J., Reinsel M.D., Maroon-Lango C.J. Identification and full sequence of an isolate of Alternanthera mosaic potexvirus infecting *Phlox stolonifera* // Arch. Virol. 2006. Vol. 151. N 3. P. 477–493.
- Mukhamedzhanova A.A., Karpova O.V., Rodionova N.P., Atabekov I.G. Nonspecific activation of translation of encapsidated potexviral RNA with involvement of potato virus X movement protein TGB1 // Dokl. Biochem. Biophys. 2009. Vol. 428. N 1. P. 239–241.

7. Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Arkhipenko M.V., Ivanov P.A., Chirkov S.N., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. Characterization of Alternanthera mosaic virus and its Coat Protein // Open Virol. J. 2011. Vol. 5. P. 136–140.

8. Kaftanova A.S., Kiselev N.A., Novikov V.K., Atabekov J.G. Structure of products of protein reassembly and reconstruction of potato virus X // Virology. 1975. Vol. 65. N 1. P. 283–287.

9. Ivanov P.A., Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. The complete nucleotide sequence of Alternanthera mosaic virus infecting

Portulaca grandiflora represents a new strain distinct from phlox isolates // Virus Genes. 2011. Vol. 42. N 2. P. 268–271.

10. Geering A.D., Thomas J.E. Characterisation of a virus from Australia that is closely related to papaya mosaic potexvirus // Arch. Virol. 1999. Vol. 144. N 3. P. 577–592.

11. Sit T.L., Leclerc D., AbouHaidar M.G. The minimal 5' sequence for in vitro initiation of papaya mosaic potexvirus assembly // Virology. 1994. Vol. 199. N 1. P. 238–242.

Поступила в редакцию  
27.07.15

## STUDY OF POTEXVIRUS RIBONUCLEOPROTEINS' SIGNAL OF ASSEMBLY

*E.K. Petrova\**, *E.A. Trifonova*, *N.A. Nikitin*, *O.A. Kondakova*, *J.G. Atabekov*, *O.V. Karpova*

*Department of Virology, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

*\*e-mail: petrova@mail.bio.msu.ru*

Formation of viral ribonucleoprotein particles during incubation of the *Alternanthera mosaic virus* 5'-end transcripts with Potato virus X (members of the *Potexvirus* genus) coat protein was studied. It was shown that the capping of *Alternanthera mosaic virus* transcripts affects the efficiency of their interaction with a coat protein. At the same time the removal of the cap structure from previously capped *Alternanthera mosaic virus* transcripts did not prevent viral ribonucleoproteins assembly. The removal of the first 100 nucleotides (the likely site for assembly initiation) had no effect on the formation of viral ribonucleoproteins. The additional evidences that the potexvirus ribonucleoproteins assembly does not depend on the RNA nucleotide sequence were obtained.

**Keywords:** *plant viruses, Alternanthera mosaic virus, Potato virus X, viral ribonucleoprotein, virion assembly, cap structure.*

### Сведения об авторах:

*Петрова Екатерина Кирилловна* — канд. биол. наук, ст. преп. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: petrova@mail.bio.msu.ru

*Трифонова Екатерина Алексеевна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: trifonova@mail.bio.msu.ru

*Никитин Николай Александрович* — канд. биол. наук, зав. сектором прикладной фитовирусологии кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

*Кондакова Ольга Александровна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-50-08; e-mail: olgakond@yandex.ru

*Атабеков Иосиф Григорьевич* — докт. биол. наук, академик, зав. кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-34; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru

*Карпова Ольга Вячеславовна* — докт. биол. наук, проф. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: okar@genebee.msu.ru