

КОНСЕРВАТИВНІ НУКЛЕОТИДНІ МОТИВИ ТА ВТОРИННІ СТРУКТУРИ В ПРОМОТОРАХ СУБГЕНОМНИХ РНК ТОБАМОВІРУСІВ

А. М. Кириченко, І. С. Щербатенко

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: kirangel.07@meta.ua*

Мета. Зважаючи на фрагментарність експериментальних даних і суперечливість уявлень щодо ролі первинних і вторинних структур РНК у активності субгеномних (сг) промоторів, метою нашої роботи було виявлення і порівняння властивостей консервативних нуклеотидних мотивів і стеблових петель у сг промоторах двох генів 38-ми тобамовірусів. **Методи.** Геномні сиквенси 17-ми штамів ВТМ та 21 штаму інших видів тобамовірусів були завантажені з ГенБанку (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Пошук і порівняльний аналіз консервативних компонентів промоторів проводили за отриманими нами одноланцюговими розгортками 3-х стеблових петель та консенсусною послідовністю мотивів трьохкомпонентного нуклеотидного блоку (ТНБ), використовуючи власні вузькоспеціалізовані комп'ютерні програми. **Результати.** Встановлено, що всі 76 досліджених сг промоторів 2-х генів 38-ми тобамовірусів містять консервативні ТНБ, які виявляються в сиквенсах мінус-ланцюгів геномних РНК за консенсусною послідовністю SSSSSnnnnnCYAAGCWWnnWWWWW, де SSSSS – GC-багатий мотив, nnnn та nn – довільні (не консенсусні) нуклеотиди, CYAAGCWWW – центральний мотив, WWWWW – AU-багатий мотив, Y – нуклеотид C або U. Ідентичність консенсусній послідовності мотивів ТНБ штамів ВТМ становить 99,5%, а мотивів ТНБ інших видів тобамовірусів – 88,3%. Ідентичність нуклеотидів стеблових петель SL1, SL2 та SLср відповідним петлям штаму ВТМ-U1 складає 74,4%, 75,7% та 60,3% відповідно. Всі 75 із 76-ти досліджених ТНБ у шостій позиції центрального мотиву містять нуклеотид C, геномні позиції якого відповідають стартовим точкам транскрипції (СТТ) сг РНК. СТТ обох генів всіх досліджених тобамовірусів локалізовані перед стартовими кодонами трансляції за винятком гена транспортного білка Вірусу кільцевої плямистості одонтоглюсума. Досліджені нами тобамовіруси чітко розподіляються на 4 групи за подібністю консервативних мотивів та заміні нуклеотидів у субгеномних промоторах. **Висновки.** Результати проведених досліджень суперечать припущенню щодо більш важливої ролі вторинних структур, а не первинних нуклеотидних послідовностей у функціональній активності сг промоторів тобамовірусів. Показана нами локалізація AU-багатих мотивів після стартових кодонів транскрипції сг РНК свідчить про можливість синтезу тобамовірусних РНК на двохланцюгових матрицях. Знайдені нами групи штамів різних видів тобамовірусів з ідентичними нуклеотидними ділянками та однаковими замінами нуклеотидів доповнюють обмежений на сьогодні перелік прояву гомологічних рядів М. І. Вавилова на молекулярному рівні, а також узгоджуються з нашим припущенням щодо молекулярних механізмів утворення гомологічних рядів – можливістю фіксації лише тих нуклеотидних заміні, які не порушують тонко збалансованого функціонування кількох генетичних кодів в одній клітині.

Ключові слова: тобамовіруси, субгеномні промотори, консервативні нуклеотидні мотиви та вторинні структури, гомологічні ряди мінливості вірусів.

Рід *Tobamovirus* є найбільшим родом родини *Virgaviridae*, який містить 29 визначених та 6 неklasифікованих видів [1]. Типовий представник тобамовірусів – Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) має одноланцюгову смислову геномну РНК, яка кодує 4 білки [2]. Два реплікативні білки 126 kDa і 183 kDa (компоненти вірусної реплікази) трансклюються безпосередньо з геномної РНК, а 32 kDa транспортний білок (ТБ) та 17,5 kDa білок оболонки (БО) – з субгеномних (сг) РНК, синтез яких ініціюється в стартових точках транскрипції (СТТ) на субгеномних промоторах, локалізованих на мінус ланцюгах геномних РНК [3].

Структурно-функціональна організація промоторів субгеномних РНК тобамовірусів залишається маловивченою у порівнянні з іншими вірусами рослин і досліджувалась переважно на моделі двох звичайних штамів ВТМ: U1, та OM. У цих штамів картовано стартові точки транскрипції субгеномних РНК генів БО і ТБ, встановлено позиції локалізації та довжину мінімальних і повністю активних промоторів, а також виявлено функціональну активність стеблових петель (stem-loop), розташованих поблизу стартових точок транскрипції сг РНК [3, 4, 5, 11].

У нашій попередній роботі [7] було встановлено, що промотори субгеномних РНК містять висококонсервативні нуклеотидні послідовності, майже ідентичні в генах ТБ і БО більшості досліджених тобамовірусів (10-ти з 15-ти), однак за даними інших дослідників [3] промотори названих генів мають різну первинну і вторинну структуру навіть у одного штаму ВТМ. Зокрема, в промоторі гена ТБ знайдено дві стеблові петлі, а в промоторі БО – лише одну. В іншій роботі [11] показано наявність двох стеблових петель в промоторах обох генів звичайного штаму ВТМ.

Зважаючи на фрагментарність і суперечливість наведених даних, наша робота була спрямована на комп'ютерний пошук та порівняльне дослідження властивостей консервативних нуклеотидних мотивів і вторинних структур у субгеномних промоторах 38-ми тобамовірусів.

Матеріали і методи. В роботі було використано геномні сиквенси 17-ти штамів ВТМ та 21 штаму інших видів тобамовірусів (табл. 1), отриманих з ГенБанку (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Пошук консервативних нуклеотидних мотивів та вторинних структур проводили в повногеномних сиквенсах та в ділянках субгеномних промоторів генів капсидного і транспортного білків, локалізованих у геномних позиціях від -300 до +100 нуклеотидів відносно стартового кодона трансляції генів.

Для порівняльного комп'ютерного аналізу консервативних елементів у промоторних ділянках вірусних РНК використовували власні вузько-спеціалізовані програми (утіліти), написані для кожної конкретної задачі досліджень [6], зокрема, вирізання з геномних сиквенсів нуклеотидних ділянок, подібних за довжиною, позиціями локалізації та кількістю збіжних нуклеотидів; пошук найбільших кластерів позиційно-зв'язаних нуклеотидних сайтів, які містяться в найбільшій кількості дослідних сиквенсів; виявлення консервативних мотивів за консенсусною послідовністю ТНБ та вторинних структур за первинними нуклеотидними послідовностями їх розгортки.

Таблиця 1

Штами ВТМ та інших видів тобамовіруси використані в роботі

№ шп	Коротка назва	Повна назва та походження	Родини рослин- хазяїв ¹⁾	Номери доступу
		Штами ВТМ		
1	u1	Звичайний штам U1	Пасльонові	J02415
2	x1	Немає	?	V01408
3	kc	NC 82 Корейський штам	?	X68110
4	im	ІМ ізолят (з бальзаміну)	Бальзамінові	AB369276
5	pet	Петунієвий штам pet	Пасльонові	AB369275
6	ch	Немає (Китайський штам)	?	AF165190
7	ch1	Китайський ізолят Fujian	?	AF395127
8	ch2	Китайський ізолят TMV-017	?	AF395128
9	ch3	Китайський ізолят TMV-152	?	AF395129
10	chm	Китайський мутант ВТМ-L	Пасльонові	AF155507.2
11	tsL	Томатний штам L (ВТМ-L)	Пасльонові	X02144
12	k1	Казахський штам K1	Пасльонові	AJ243571
13	k2	Казахський штам K2	Пасльонові	Z92909
14	pt	Петунієвий штам pet-TW	Пасльонові	EF392659
15	b9	Ізолят В935А (Vicia faba)	Бобові	AJ011933
16	cr	ВТМ із хрестоцвітих	Хрестоцвіті	Z29370
17	ob	Штам Ob	?	L11665
		Тобамовіруси		
1	TMGMV	Вірус м'якої зеленої мозаїки тютюну	Пасльонові	M34077
2	CGMMV	Вірус зеленої плямистої мозаїки огірка	Гарбузові	D12505
3	PMMV	Вірус м'якої плямистості перцю	Пасльонові	M81413
4	RMV-S	Вірус мозаїки подорожника ізолят. Shanghai	Подорожникові	AF254924
5	ToMV	Вірус мозаїки томатів	Пасльонові	AF332868
6	CrTV-W	Тобамовірус хрестоцвітих штам Wasabi	Хрестоцвіті	AB017503
7	CFMMV	Вірус м'якої плямистості плодів огірка	Гарбузові	AF321057
8	ORSV	Вірус кільцевої плямистості одонтогლოსума	Орхідні	X82130
9	TVCV	Вірус посвітління жилок турнепсу	Хрестоцвіті	U03387
10	ObPV	Вірус перцю обуда	Пасльонові	D13438
11	ZGMMV	Вірус зеленої плямистої мозаїки цукіні	Гарбузові	AJ295949
12	KGMMV	Вірус зеленої плямистої мозаїки кіурі	Гарбузові	AJ295948
13	HLSV	Сінгапурський латентний вірус гібіскусу	Мальвові	AF395898
14	BMMV	Вірус м'якої плямистості бругмансії	Пасльонові	AM398436
15	CrTV-U	Тобамовірус хрестоцвітих (unclassified)	Хрестоцвіті	AU318866
16	CRMV	Вірус мозаїки китайської ріпи	Хрестоцвіті	EU571218
17	YoMV	Вірус мозаїки йокаї	Хрестоцвіті	U30944
18	RMV-I	Вірус мозаїки подорожника ізолят Impatiens	Подорожникові	DQ223770
19	ВРeMV	Вірус плямистості болгарського перцю	Пасльонові	DQ355023
20	MMV	Вірус мозаїки маракуї (пасифлори)	Пасифлорові	DQ356949
21	СММoV	Вірус м'якої плямистості кактуса	Кактусові	EU043335

¹⁾ «?» - родин рослин-хазяїв не знайдено (не наведено в анотаціях сиквенсів)

Наведені в роботі нуклеотидні сайти представлені з використанням кодів нуклеотидів, рекомендованих Міжнародним біохімічним союзом (IUB): A, T (U), G, C – стандартні нуклеотиди; R – пуринові (puRine, A/G); Y – піримідинові (pYrimidine, C/T); S – сильні (Strong, G/C); W – слабкі (weak, A/T); M – аміновмісні (aMine, A/C); K – кетовмісні (Ketone, G/T). Геномні сиквенси та нуклеотидні ділянки штамів ВТМ у тексті позначені англійськими літерами, а сиквенси та нуклеотидні сайти інших тобамовірусів – їх порядковими номерами відповідно до таблиці 1. Позиції локалізації консервативних мотивів та вторинних структур, виявлених на плюс і мінус- ланцюгах РНК, подані як порядкові номери їх початкових нуклеотидів відносно 5'- або 3'-кінців позитивних ланцюгів [3].

Результати. *Консервативні нуклеотидні мотиви в субгеномних промоторах тобамовірусів. Трьохкомпонентні блоки в промоторах штамів ВТМ.* У нашій попередній роботі [7] було показано, що ділянки сг промоторів транспортного та капсидного білків більшості досліджених тобамовірусів (10-ти із 15-ти) містять майже ідентичні трьохкомпонентні нуклеотидні блоки (ТНБ) на позитивних ланцюгах РНК. Шляхом порівняльного комп'ютерного аналізу виявлених ТНБ нами встановлено консенсусну послідовність SSSSSnnnnnCYAAGCWWnnWWWWW для виявлення ТНБ на негативних ланцюгах вірусних РНК. Вона містить 5-ти нуклеотидний (нт) GC-багатий мотив SSSSS, 2 та 5 довільних (не консенсусних) нуклеотидів n, 9-нт центральний мотив CYAAGCWWW, та 5-ти нт AU-багатий мотив WWWWW. За цією консенсусною послідовністю нами знайдено майже ідентичні консервативні ТНБ у субгеномних промоторах генів капсидного і транспортного білків всіх 17-ти досліджених штамів ВТМ.

Всі три мотиви 34-х ТНБ (17 штамів по 2 гени) мають повну збіжність нуклеотидів з консенсусною послідовністю (19 з 19), за винятком трьох замін: в AU-багатому мотиві гена БО штаму сг та GC-багатому мотиві генів ТБ і БО штаму об. Оскільки 19-ти нт ділянки 34-х ТНБ містять 646 (19 x 34) нуклеотидів і мають лише 3 нуклеотидні заміни, ідентичність мотивів ТНБ штамів ВТМ консенсусній послідовності становить 99,5% (643/646).

Відносно мотивів ТНБ генів ТБ і БО штаму ВТМ-U1 відповідні мотиви решти 16-ти штамів вірусу мають 19 нуклеотидних замін: по одній у GC-багатому мотиві генів БО 4-х штамів (tsl, k1, k2, chm); вісім у GC- та AU-багатих мотивах генів ТБ і БО штаму сг та 7 замін у мотивах двох генів штаму об. Зважаючи на те, що ТНБ 16-ти штамів ВТМ містять 608 нуклеотидів (16 штамів x 2 гени x 19 нт) і мають 19 нуклеотидних замін, ідентичність мотивів ТНБ цих штамів відповідним мотивам штаму ВТМ-U1 складає 96,9% (589/608).

Шості нуклеотиди центральних мотивів ТНБ 10-ти штамів (u1, kc, x1, im, ret, ch, ch1, ch2, ch3, b9) мають геномні позиції 4838 або 5703, які є відомими стартовими точками транскрипції субгеномних РНК генів ТБ і БО штаму ВТМ-U1 відповідно [3]. Зважаючи на це, знайдені нами позиції шостих нуклеотидів центральних мотивів ТНБ, очевидно, являють собою стартові точки транскрипції субгеномних РНК штамів ВТМ. Крім названих 10-ти штамів, однакові позиції СТТ сг РНК генів ТБ – 4805 і БО – 5694 мають штами tsL, k1, k2 та chm. СТТ сг РНК генів ТБ і БО решти

3-х штамів ВТМ: pt, sg та ob знаходяться в геномних позиціях 4818 і 5653, 4805 і 5584 та 4853 і 5742 відповідно.

Таким чином, 3 мотиви ТНБ субгеномних промоторів генів ТБ і БО 17-ти досліджених штамів ВТМ мають майже однакові властивості: 99,5% ідентичності консенсусній послідовності; 96,9% ідентичності відповідним мотивам звичайного штаму ВТМ; наявність нуклеотида С у шостих позиціях центрального мотиву, геномні позиції якого відповідають стартовим точкам транскрипції субгеномних РНК; ідентичність нуклеотидів центральних мотивів та наявність замінів від 1-го до 4-х нуклеотидів у АУ-та/або GС-багатих мотивах; локалізація СТТ sg РНК і GС-багатих мотивів перед стартовими кодонами трансляції генів, а АУ-багатих мотивів – після них.

Трьохкомпонентні нуклеотидні блоки в субгеномних промоторах тобамовірусів. Промотори гена БО. Консервативні трьохкомпонентні нуклеотидні блоки субгеномних промоторів гена БО досліджених тобамовірусів подібні відповідним ТНБ штамів ВТМ за наявністю високої збіжності з консенсусною послідовністю та з мотивами ТНБ ВТМ-U1; за локалізацією СТТ, GС- та АУ-багатих мотивів відносно стартової точки транскрипції генів, а також за наявністю нуклеотиду С у шостій позиції центрального мотиву всіх вірусів за винятком Вірусу зеленої плямистої мозаїки цукіні (табл. 2, вірус 11). У цього виду тобамовірусу, а можливо і в інших видів, які інфікують рослини родини гарбузових (віруси 7, 12), стартовою точкою транскрипції може бути нуклеотид С, локалізований у сьомій позиції центрального мотиву.

АУ-багаті мотиви ТНБ гена БО всіх досліджених тобамовірусів подібно АУ-багатим мотивам ТНБ обох генів штамів ВТМ починаються на відстані двох нуклеотидів від кінця центрального мотиву, однак відстані між GС-багатим і центральним мотивом варіюють від 4-х до 8-ми нуклеотидів.

П'ять тобамовірусів, виділених з рослин родини Хрестоцвітих (6, 9, 15, 16, 17), а також 2 віруси з родини Подорожникових (4, 18) мають повну збіжність нуклеотидних блоків з консенсусом, однакові позиції СТТ відносно стартового кодона трансляції (-20), а також однаковий мотив GСGGC. Віруси, адаптовані до родини Пасльонових, мають інші позиції СТТ: -9 (віруси 3, 5), -11 (вірус 14) або -12 (віруси 19, 1, 10), а також більшу варіабельність збіжності нуклеотидів з консенсусом: від 16 до 19. Віруси, що інфікують рослини родин Орхідних, Пасифлорових та Мальвових (віруси 8, 13, 20 відповідно) мають близьку збіжність нуклеотидів з консенсусом (15-17), але дещо варіабельні позиції СТТ (-9...-38). Найбільша варіабельність за збіжністю з консенсусом та позиціями СТТ спостерігається в нуклеотидних блоках тобамовірусів, адаптованих до родин Кактусових та Гарбузових: позиції -13...-199 і збіжність 12 - 15 (табл. 2, віруси 21, 7, 11, 12, 2). Отже, подібність консервативних нуклеотидних блоків у субгеномних промоторах генів БО тобамовірусів значною мірою залежить від родини рослин-хазяїв вірусу, однак віруси різних хазяїв можуть мати ідентичні блоки чи мотиви та/або позиції їх локалізації (віруси 6 - 17 та 4,18). Поряд з цим різні блоки, мотиви та/або позиції їх локалізації можуть мати віруси рослин-хазяїв однієї родини (табл. 2, віруси 5 – 14 та 7 – 2).

Таблиця 2

**Консервативні трьохкомпонентні нуклеотидні блоки (ТНБ)
у ділянках промоторів субгеномних РНК генів БО 21 видів
тобамовірусів**

Тобамовіруси ¹⁾	Консенсусна послідовність ТНБ та відповідні їй три консервативні мотиви на (-)РНК ²⁾		Збіжність ³⁾		СТТ ⁴⁾	
 SSSSS C YAAG C WWW . . WWW . . .		КП	U18		
9	Хрестоцвітні	cuuuauGCGGCcaggaCUAAGCAAuuAAAUUuuc	19	16	5583	-20
6		cuucacuGCGGCcaggaCUAAGCAAugaAUUAUuuc	19	14	5570	-20
15		cucuauGCGGCcaggaCUAAGCAAuguUAUAUuuc	19	14	5575	-20
16		cuguauGCGGCcaggaCUAAGCAAuguUAUAUuuc	19	14	5572	-20
17		cucuauGCGGCcaggaCUAAGCAAuguUAUAUuuc	19	14	5575	-20
4	По	cucuauGCGGCcaggaCUAAGCAAuguUAUAUuuc	19	14	5572	-20
18		cucuauGCGGCcaggaCUAAGCAAuguUAUAUucc	19	14	5574	-20
5	Пасльонові	cagccaGCGCCuaagaCUAAGCAUAAUUAUAUcag	19	17	5694	-9
3		uagccuGCGGCucagaagAACCAAuuUgAUAccg	16	16	5676	-9
19		cuaucuGCGCCuaaggCUAAGCAUgaaUAUUAua	18	15	5683	-12
1		cagauaGCGCaguagcUCAUGC AAAuuUAguUua	16	12	5654	-12
10		uucGCuCuauaguaggCUAAGCAAuaAAUUAgua	17	13	5742	-12
14		aucGCuCCacagaaggCUAAGCAAuaAAcUUuac	17	13	5698	-11
8	Ор	uaaacuGCGuGuuagaCUuAGCAUAAUUAUAUcag	17	15	5719	-9
20	Па	acuaacGCCuCaguugcCaAACUUAuuAAgAUgac	16	9	6103	-23
13	Ма	aaaaaguCCuCGccucUCAAGCAUaugAUgUcuua	15	9	5762	-38
21	Ка	uuucagGGUGGuauuaGUAAaCUAUuaUUGAgaca	14	9	5536	-199
7	Гарбузові	ccaaguuGGGaaaaaaCUAAGCcaAaggcUAAUgccc	15	12	5684	-162
11		ccaaguuGGGaaagaagCUAAGucAAaggAUAAUguc	15	11	5695	-170
12		cagacuGCGGagguuaauUAAaCCUAagAcAAAgccc	14	11	5654	-212
2		aaucucCaGCgaacaaAUcAGGgAUguUgAUUgag	14	11	5492	-271

¹⁾ Порядкові номери тобамовірусів за таблицею 1 та родини їх рослин-хазяїв: По – Подорожникові, Ор – Орхідні, Ма – Мальвові, Па – Пасифлорові, Ка – кактусові. Чорним фоном виділено СТТ субгеномних промоторів (нуклеотид С), а також 7 тобамовірусів, у яких позиції СТТ, наведені в таблиці, відповідають знайденим американськими дослідниками [3].

²⁾ Консенсусна послідовність ТНБ: SSSSS – GC-багатий мотив, C YAAGCWWW – 9-нуклеотидний центральний мотив, WWWWW – AU-багатий мотив, n - ділянки довільних (не консенсусних) нуклеотидів, виділені сірим фоном. Підкреслені заміни нуклеотидів у мотивах відносно відповідних мотивів штаму BTM-U1. Нуклеотидні заміни відносно консенсусної послідовності показано малими літерами.

³⁾ Сумарна кількість нуклеотидів, збіжних з консенсусною послідовністю (КП) та з мотивами штаму BTM-U1 (U1).

⁴⁾ Позиції стартових точок транскрипції (СТТ) субгеномних РНК відносно 5' кінців вірусних геномів та стартових точок трансляції генів – позитивні і негативні значення, відповідно.

19-ти нк ділянки ТНБ генів БО 21 штаму тобамовірусів містять 399 нуклеотидів (19X21), сумарна збіжність яких з консенсусною послідовністю становить 357 (19 x 8 + 18 + 17 x 3 + 16 x 4 + 15 x 2 + 14 x 3), а ідентичність мотивів ТНБ консенсусній послідовності – 89,5% (357/399). За аналогічним підрахунком ідентичність мотивів ТНБ відповідним мотивам штаму BTM-U1 складає 68,4% (273/399). Значно менша ідентичність мотивів ТНБ тобамовірусів відповідним мотивам звичайного штаму BTM у порівнянні з ідентичністю консенсусній послідовності зумовлена, перш за все, значною відмінністю їх AU-багатих мотивів: UUAUA (у BTM) і

UAUUAU та їм подібним у промоторах гена БО інших видів тобамовірусів. Цікаво, що промотори гена ТБ штамів ВТМ містять мотив AAUUAU, а гена БО – UUAUA, які є варіантами заміни всіх нуклеотидів А на U і навпаки. Наявність такої закономірності у багатьох штамів вірусу свідчить про можливість її причетності до забезпечення різної експресії генів ТБ і БО: синтез малої кількості транспортного білка на ранній стадії інфекції та інтенсивний синтез великої кількості білка оболонки на пізній стадії.

Промотори гена ТБ. У субгеномних промоторах гена ТБ досліджених тобамовірусів консервативні нуклеотидні блоки варіюють значно більше, ніж у промоторах генів БО та промоторах обох генів 17-ти штамів ВТМ. Повну збіжність нуклеотидів з консенсусною послідовністю (19 з 19) мають лише 4 тобамовіруси, 18-ти нт збіжність – 3, 16-ти нт – 9, 15-ти нт – 4 та 14-ти нуклеотидну збіжність – 1 тобамовірус. Сумарна збіжність нуклеотидів мотивів ТНБ з консенсусною послідовністю становить 348 (19 x 4 + 18 x 3 + 16 x 9 + 15 x 4 + 14), а їх сумарна кількість у ТНБ 21 штаму – 399 (19 x 21). За цими даними ідентичність консенсусній послідовності мотивів ТНБ субгеномних промоторів гена ТБ досліджених тобамовірусів становить 87,2% (348/399), а їх ідентичність відповідним мотивам штаму ВТМ-U1 за аналогічним підрахунком складає 63,7% (254/399).

Поряд з досить вираженою мінливістю консервативних мотивів нуклеотидні заміни в них не перевищують 2 з 5-ти (в AU- та GC-багатих мотивах) та 3 з 9-ти (в центральному мотиві). Як і в ТНБ генів БО AU-багаті мотиви ТНБ гена ТБ починаються на відстані двох нуклеотидів від кінця центрального мотиву, однак відстані між GC-багатим і центральним мотивом у ТНБ гена ТБ варіюють значно менше у порівнянні з геном БО. Ці відстані є 5-нуклеотидними, за винятком 6-нт у двох вірусів та 4-нт у одного.

Промоторні ділянки гена ТБ семи тобамовірусів (1, 3, 5, 8, 9, 10, 17), знайдені нами методом комп'ютерного аналізу, виявились ідентичними відповідним ділянкам, знайденим американськими вченими методом делеційного аналізу та сайт-спрямованого мутагенезу [3]. Картовані авторами позиції стартових точок транскрипції субгеномних РНК гена ТБ цих вірусів відповідають позиціям шостого нуклеотида центрального мотиву. Оскільки 75 із 76-ти досліджених нами ТНБ (38 вірусів по 2 гени) у шостій позиції центрального мотиву містять нуклеотид С, геномні позиції якого у звичайного штаму ВТМ і названих 7-ми тобамовірусів відповідають стартовим точкам транскрипції субгеномних РНК, шостий нуклеотид центрального мотиву ТНБ, очевидно, є стартовою точкою транскрипції субгеномних РНК, а його геномні позиції відповідають позиціям СТТ.

Позиції СТТ відносно першого нуклеотида стартового кодона трансляції генів ТБ варіюють від -36 до -148, за винятком СТТ Вірусу кільцевої плямистості одонтоглосума, яка локалізована не перед, а після стартового кодона трансляції у позиції +7. Про подібне явище у інших тобамовірусів не повідомлялось. У всіх інших досліджених нами 75-ти сг промоторів 38-ми тобамовірусів стартові точки транскрипції генів ТБ і БО локалізовані перед відповідними генами.

Подібність консервативних мотивів субгеномних промоторів гена ТБ досліджених тобамовірусів не має чітко вираженої залежності ні від виду вірусу, ні від родини та виду рослини-хазяїна. Так, однаково збіж-

ність мотивів ТНБ з консенсусною послідовністю мають віруси різних родин рослин: Пасльонових і Хрестоцвітих (19 з 19-ти); Хрестоцвітих, Подорожникових, Орхідних, Мальвових, Гарбузових та Пасифлорових (16/19); Гарбузових і Пасльонових (15/19). Однакові заміни нуклеотидів у центральному та GC-багатому мотивах мають три віруси родини Хрестоцвітих (15, 16 і 17), а також два віруси родини Подорожникових (4, 18).

Висока схожість консервативних нуклеотидних мотивів у субгеномних промоторах генів БО і ТБ всіх 38-ми досліджених тобамовірусів дає підставу вважати, що вони відносяться до важливих елементів регулювання транскрипції вірусних генів. Однак за даними літератури [3] для функціональної активності субгеномних промоторів звичайного штаму ВТМ більш важливі не первинні нуклеотидні послідовності, а їх вторинна структура: стеблові петлі. Тому наступним етапом наших досліджень було виявлення і порівняння властивостей стеблових петель у субгеномних промоторах тобамовірусів.

Консервативні вторинні структури в субгеномних промоторах тобамовірусів. Стеблові петлі SL1 у промоторах гена ТБ. Для виявлення SL1 у субгеномних промоторах тобамовірусів було отримано 21-нуклеотидну одноланцюгову розгортку її вторинної структури, встановленої методом комп'ютерного передбачення за програмою MFOLD у промоторі гена ТБ штаму ВТМ-U1 [3]. Отримана нами розгортка петлі SL1 містить 17-ти нуклеотидне стебло з порядковими номерами комплементарних нуклеотидів 1-9, пару некомплементарних нуклеотидів (U, C) у позиції 4, неспарений нуклеотид A в позиції 8 та петлю UAUU (табл. 3). Нуклеотидні послідовності, відповідні розгортці вторинної структури стеблової петлі SL1 виявлені нами в геномних сиквенсах всіх 17-ти штамів ВТМ і 15-ти штамів інших видів тобамовірусів, проте в сиквенсах 6-ти вірусів (2, 7, 11, 12, 20, 21) вони не знайдені.

Позиції локалізації розгортки SL1 відносно 5'-кінця геномів варіюють від 4759 до 4872, однак відносно 3'-кінця вони однакові в усіх досліджених вірусів (-31), за винятком тобамовірусу 14 (-35). Нуклеотидні послідовності стебел і петель восьми штамів ВТМ (im, x1, kc, ch1, ch2, ch3, ret, chm) і тобамовірусу 19 виявились ідентичними таким у штаму U1. Послідовності штамів b9, tsL, k1, k2, chm та тобамовірусу 5 мають некомпенсаційну заміну C на u у 9-тій позиції стебла, яка призводить до втрати комплементарності GC пари. Штам pt має заміну A на g у 8-ій позиції стебла, а штам ob і тобамовірус 10 – заміну A на g та компенсаційну заміну в 5-ій позиції стебла (C на u та G на a). Штам sg та тобамовіруси 4, 9, 15, 16, 18, 6, 17, 8 і 13 мають по дві компенсаційні заміни на кінцях стебел у позиціях 1 і 2 (табл. 3).

В цілому, в субгеномних РНК всіх 17-ти штамів ВТМ і 15-ти із 21-го штамів інших видів тобамовірусів стеблові петлі дуже схожі з такими у звичайного штаму ВТМ. Оскільки сумарна кількість нуклеотидів і комплементарних нуклеотидних пар у стеблових петлях 38-ми тобамовірусів становить 798 (21 x 38) і 266 (7 x 38) відповідно, а сумарна кількість збіжних з петлею ВТМ – 597 і 209 (табл. 3), ідентичність SL1 досліджених тобамовірусів і ВТМ-U1 становить 74,4 % (597/798) за нуклеотидами та 78,6% (209/266) за комплементарними парами.

Таблиця 3

**Стеблові петлі субгеномних промоторів тобамовірусів,
подібні петлі SL1 гена ТБ звичайного штаму BTM**

Стеблові петлі на (-)РНК ¹⁾	Позиції ²⁾	Збіжність ³⁾			Тобамовіруси ⁴⁾
		нук	пар	ком	
123456789 9-7654321 CCCJCCCAAGUAUUU-UGGC GGG	4807	21	7	0	u1, im, x1, kc, ch1, ch2, ch3, pet, chm, 19
... * ... u- ...	4810	20	6	0	b9, tsL, k1, k2, chm, 5
... g ... - ...	4787	20	7	0	pt
... u . g ... - . . a ...	4822	18	7	1	ob,10
gg - cc	4759	17	7	2	cr, 4, 9, 15, 16, 18
. a ua * - u .	4808	17	6	1	3
u* * u- cu	4794	17	4	0	1
gg * u- cc	4760	16	6	2	6
gg g - cc	4762	16	7	2	17
. * u . . g . . . g . . . - . . a . . . a .	4793	16	6	1	14
ga g . . . g . . . - uc	4790	15	7	2	8
ga . . u* * caa u- ccu uc	4872	9	4	3	13

¹⁾ Розгортка стеблевої петлі SL1 штаму BTM-U1 подана великими літерами, комплементарні нуклеотиди стебел – однаковими цифрами, не комплементарні нуклеотиди – чорним фоном, ділянки петель – сірим фоном. Заміни нуклеотидів відмічені малими літерами: компенсаційні заміни – жирним шрифтом. Пари комплементарних нуклеотидів, збіжних з стебловою петлею позначені точками, непарні збіжні нуклеотиди – зірочками.

²⁾ Позиції стеблових петель на (-)РНК відносно 5' кінця (+)РНК.

³⁾ Кількість: нук – нуклеотидів збіжних з послідовністю стеблевої петлі; пар – пар комплементарних нуклеотидів; ком – компенсаторних нуклеотидних замін, за яких зберігається вторинна структура стеблових петель).

⁴⁾ Штами BTM та порядкові номери тобамовірусів за таблицею 1.

Заміни нуклеотидів найчастіше зустрічаються в неспареній 8-мій позиції стебла (але лише А на g), а в 4-тій некомплементарній нуклеотидній парі стебла вони зовсім відсутні (табл. 3). Компенсаційні заміни нуклеотидів виявляються лише в 1-ій, 2-ій, 5-ій та 9-ій позиціях стебла; найчастіше в першій і другій позиції.

Наведені дані свідчать про високу консервативність (функціональну важливість) вторинної структури нуклеотидних послідовностей у різних видів тобамовірусів. В той же час подібні консервативні вторинні структури не виявляються у тобамовірусів, адаптованих до рослин родин Гарбузових (віруси 2, 7, 11, 12), Пасифлорових (20) та Кактусових (21). Однакові нуклеотидні послідовності та/або однакові заміни нуклеотидів мають 4 групи тобамовірусів, які включають: 9 штамів BTM (u1, im, x1, kc, ch, ch1, ch2, ch3, pet) і тобамовірус 19; 5 штамів BTM (b9, tsL, k1, k2, chm) і тобамовірус 5; штам ob і тобамовірус 10; штам cr і тобамовіруси 4, 9, 15, 16, 18, 6 та 17 (табл. 3).

Стеблові петлі SL2 у промоторах гена ТБ. Для виявлення SL2 у субгеномних промоторах тобамовірусів нами отримана 47-нуклеотидна одноланцюгова розгортка, що відповідає вторинній структурі цієї петлі, встановленій американськими вченими [3]. Отримана нами одноланцюгова послідовність містить стебло з 4-ма ділянками комплементарних пар нуклеотидів (1 і 2, 3 - 6; 7 - 9, b - j); три петлі (АСАА, АСUU, UAA); некомплементарну пару нуклеотидів G і U у позиції h; неспарені нуклеотиди А і С, С, G у позиціях x, y, z відповідно (табл. 4).

Стеблові петлі, подібні SL2, виявлені нами у промоторах гена ТБ всіх 17-ти штамів ВТМ і 19-ти з 21-го штамів інших видів тобамовірусів. У двох видів (віруси 20, 21) нуклеотидних послідовностей, подібних розгортці SL2, не знайдено. Виявлені стеблові петлі групи штамів ВТМ St10: u1, im, x1, kc, ch1, ch2, ch3, pet, ch, b9 є ідентичними SL2 звичайного штаму цього вірусу. Штам pt має 2 нуклеотидні заміни, а штами ob і cr – 13 і 14 замін відповідно, що становить 34 і 33 збіжних нуклеотидів. У 18-ти тобамовірусів збіжність нуклеотидів варіює від 43 до 21 (табл. 4).

Таблиця 4
Стеблові петлі в субгеномних промоторах тобамовірусів, подібні петлі SL2 гена ТБ звичайного штаму ВТМ

Стеблові петлі на (-)РНК ¹⁾	Збіжність ³⁾			Тобамовіруси ⁴⁾
	нук	пар	ком	
12...3456...789... CGACAAAGCAACUUGUUAACACGCAUAAUGUGUGUACACCGUCUCCG	47	15	0	St10
...c...u...*	45	14	0	pt
...uc...g...*	43	14	0	Tb5
...cc...*g.a*	41	14	0	3
...uc...u...g...*	40	14	1	19
a.guuc.g.u.a...*	34	13	3	ob, 10
...uc.uug.u.a...*	34	10	2	9
...uc.uugg.u.a...*	33	9	2	cr
u.uc.uua.u.a...*	33	9	2	4,15,16,17,18
...uc.uug.u.a...*	32	9	2	6
...uc...a.u.a.*	32	10	2	14
ucgag...a.u.a...*	28	8	1	8
...gu.usa...aaa.*	27	9	0	2
...uuug.a...aa.*	27	6	0	7
...uuug.a...aaa.*	25	7	2	11, 12
a.uuuc.*gg.acc...*	24	6	3	13
...ac...*g.gccu**	21	5	0	1

1), 3), 4) Наведено в таблиці 3.

St10 – 10 штамів ВТМ: u1, b9, im, x1, kc, ch1, ch2, ch3, pet, ch.

Tb5 – тобамовірус 5 (Вірус мозаїки томатів) і 4 штами ВТМ: tsL, k1, k2, chm

Враховуючи сумарну кількість нуклеотидів (1784 = 47 x 38) і комплементарних нуклеотидних пар (570 = 15 x 38) у 47-нт стеблових петлях 38-ми тобамовірусів, а також сумарні величини їх збіжності зі стебловою петлею ВТМ-U1: 1352 і 419 відповідно, ідентичність петель SL2 досліджених тобамовірусів відповідній петлі звичайного штаму ВТМ становить 75,7% (1352/1786) за нуклеотидами і 73,5% (419/570) за комплементарними парами нуклеотидів.

Через малу кількість комплементарних пар нуклеотидів у стеблах, особливо на ділянці 1-6, знайдені нами стеблові петлі частини тобамовірусів, які мають менше 13 комплементарних пар, очевидно, не відповідають вторинній структурі SL2, передбаченій за програмою MFOLD у промоторі гена ТБ звичайного штаму ВТМ. Цілком можливо, що у різних видів тобамовірусів функцію SL2 можуть виконувати різні вторинні структури, що відрізняються від стеблової петлі звичайного штаму ВТМ. В аспекті загальних властивостей можливих вторинних структур привертає увагу висока стабільність деяких нуклеотидів у певних позиціях: G у позиції h, U у позиціях 6, 8, 9; A в x та 8; C та G в позиціях 1 і 2, а також обмеженість замін нуклеотидів у петлі UAA та в 3'-кінцевій ділянці стеблової петлі SL2.

Стеблові петлі SLcp у промоторах гена БО. Оскільки вторинна структура повністю активного субгеномного промотора гена БО звичайного штаму BTM має вигляд одної довгої стеблової петлі SLcp, верхня частина якої є суттєвою для транскрипції, а нижня виконує ехансерну роль [3], нами проведено пошук верхньої частини цієї петлі у промоторах гена БО 38-ми тобамовірусів.

Для пошуку було використано одноланцюгову розгортку 55-нуклеотидної ділянки стеблової петлі, локалізованої перед стартовою точкою транскрипції гена БО. Нуклеотидна послідовність отриманої розгортки містить 4 ділянки комплементарних стеблових нуклеотидів з порядковими номерами 1-6, 7-9, *b-h*, *i-k*; петлі ACUA, CCU, AUGACAG, CCUA, AA та неспарений нуклеотид А (табл. 5). Розгортка SLcp включає також консервативні сайти GCGGC, CUAAGCWWW та WWW, виділені жирним шрифтом в останньому рядку таблиці. Ці сайти відповідають консенсусній послідовності консервативних ТНБ тобамовірусів і являють собою GC-багатий, центральний та частину AU-багатого мотиву.

Проведені дослідження показали (табл. 5), що група штамів BTM St6: u1, b9, im, x1, kc, ch, мають однакову 55-нуклеотидну послідовність, яка відповідає вторинній структурі SLcp, передбаченій за програмою MFOLD у промоторі гена Ср звичайного штаму BTM-U1. У чотирьох штамів BTM (ch1, ch2, ch3, pet) наявна некомпенсаційна нуклеотидна заміна С на у у

Таблиця 5

Стеблові петлі субгеномних промоторів тобамовірусів, подібні петлі SLcp гена БО звичайного штаму BTM

Стеблові петлі на (-)РНК ¹⁾										Збіжність ³⁾		Тобамовіруси ⁴⁾
123456	789	bdefh	ijk	kjihfedb	987	654321	нук	пар				
UAAAUU	AGCU	ACUA	CUAAG	CCU	CCG	AUGACAG	CGGCUUAGCCUAAG	CAAAA	UUUA	55	17	St6
.....	54	16	ch1, ch2, ch3, pet
.....	48	14	pt
...c..	41	12	tsL, k1, k2, 5
...c..	39	10	chm
a.gca..	37	10	8
c..*	36	8	19
a*uc..	35	9	3
g.c.cc.	28	5	13
a*cuccu	27	5	1
guugc	27	11	14
**uaa*	27	3	16
**uaa*	26	3	4,15,18
auuca.	26	4	9
auuca	25	6	cr
c*uaa*	25	3	17
a.uca*	24	6	6
aguuaa.	24	4	11
UAAAUUAGCCUAACUAAGCCUCCGAUGACAGCGGC	22	6	ob, 10
71	41	41	53	42	34		13	63	15	19	4	

1), 3), 4) Наведено в таблиці 3. St6 – 6 штамів BTM (u1, b9, im, x1, kc, chm).

У верхньому рядку таблиці великими літерами жирного шрифту подано 17 стеблових нуклеотидів петлі SLcp, у нижньому рядку – 17 консенсусних нуклеотидів трьохкомпонентного нуклеотидного блоку. Числа – кількість замін нуклеотидів у стеблах (71, 41, 53, 34), петлях (41, 42), консервативних мотивах (13, 15, 4) та не консенсусних ділянках ТНБ (63, 19)

позиції j ; у штаму *pt* – 4 заміни в ділянках петель (А на *u*, U на *a*, А на *u*, С на *u*) та 3 некомпенсаційні заміни в стеблових ділянках (U на *c*, С на *u*, U на *c*) у позиціях 9, j та *e*, відповідно. Штами *tsL*, *k1*, *k2*, *chm* та вірус мозаїки томатів мають 6 замін у петлях (А на *u*, С на *g*, А на *c*, U на *a*, А на *c*), 2 компенсаційні заміни в стеблах у позиції *e* (А на *u*, U на *a*), а також 5 некомпенсаційних замін у позиціях 5, 7, f , j , *i*. Поряд з цим штам *chm* має дві додаткові некомпенсаційні заміни в позиціях 8 та *b*.

Консервативні нуклеотидні мотиви: GCGGC, CUAAGCWWW та WWW, які відповідають консенсусній послідовності трьохкомпонентних нуклеотидних блоків у субгеномних промоторах тобамовірусів не співпадають з компонентами стеблових петель і мають більшу консервативність за них. Так, 17-нуклеотидні комплементарні ділянки стебел містять 199 замін (71+41+53+34), а 17-нуклеотидні мотиви ТНБ – 91 заміну (30+28+33), тобто в 2,19 рази менше (табл. 5). Враховуючи те, що заміни G на C і C на G у ділянці GCGGC, а також А на U і U на А в ділянках UUA та AAA не зменшують відповідності мотивів ТНБ їх консенсусній послідовності, ці мотиви мають лише 35 замін (13+18+4), які можуть впливати на активність промоторів. У 17-нуклеотидних ділянках стеблових петель таких замін у 5,7 рази більше (199/35). Значно більша мінливість стеблових петель, ніж мотивів ТНБ не узгоджується з даними про більшу роль вторинних структур, а непервинних нуклеотидних послідовностей у функціональній активності субгеномних промоторів тобамовірусів [3].

Обговорення. Комп'ютерний пошук консервативних нуклеотидних мотивів у субгеномних промоторах генів ТБ і БО був започаткований нами в 30-ти промоторних ділянках сиквенсів геномних РНК 3-х штамів ВТМ та 12-ти штамів інших видів тобамовірусів. Шляхом послідовних етапів пошуку найбільших кластерів найдовших позиційно-зв'язаних нуклеотидних сайтів у найбільшій кількості промоторних ділянок було знайдено: 1) мотиви TCGTT, TTCGT, TTCGTTT, ATTCGTT та GATTCGT у 22-х, 19-ти, 13-ти, 7-ми та 8-ми ділянках відповідно; 2) мотиви GATTCGTTT або GGTTTCGTTT у 8-ми промоторних ділянках; 3) нуклеотидні мотиви, подібні GATTCGTTT або GGTTTCGTTT, у 24 промоторних ділянках (12 вірусів по 2 гени); 4) подібні трьохкомпонентні нуклеотидні блоки у 24-х промоторних ділянках [7].

За подібними ТНБ, знайденими у 24-х ділянках субгеномних промоторів на (+)ланцюгах геномних РНК, було встановлено 19-нуклеотидну консенсусну послідовність, за якою ми виявили подібні ТНБ у 76-ти ділянках субгеномних промоторів, локалізованих на мінус ланцюгах геномних РНК 38-ми досліджених тобамовірусів. Консервативні 35-нуклеотидні ділянки субгеномних промоторів генів ТБ та БО звичайного штаму ВТМ, а також промоторні ділянки гена ТБ семи інших тобамовірусів 1, 3, 5, 8, 9, 10, 17, знайдені нами методом комп'ютерного аналізу, є ідентичними відповідним ділянкам, знайденим американськими вченими методом делеційного аналізу та сайт-спрямованого мутагенезу [3]. Картовані на сьогодні стартові точки транскрипції субгеномних РНК генів тобамовірусів відповідають позиціям шостого нуклеотиду центрального мотиву ТНБ (нуклеотид С) у всіх досліджених нами 76-ти субгеномних промоторів, за винятком гена БО вірусу зеленої плямистої мозаїки цукіні (тобамовірус 11).

Отже, отримані нами дані повністю узгоджуються з наявними в доступних публікаціях, а також демонструють подібність консервативних мотивів у субгеномних промоторах нових (раніше не досліджених) 16-ти штамів ВТМ та 14-ти штамів інших видів тобамовірусів.

Дуже висока стабільність мотивів ТНБ в усіх досліджених промоторах генів ТБ і БО (табл. 2), а також широке варіювання розгортки стеблових петель за кількістю збіжних нуклеотидів, комплементарних нуклеотидних пар та компенсаторних нуклеотидних замінів (табл. 3, 4, 5) суперечать висновку про більш важливу роль вторинних структур, а не первинних послідовностей у забезпеченні функціональної активності субгеномних промоторів тобамовірусів [3]. Цей висновок вбачається некоректним, поперше, тому, що первинні послідовності детермінують всю структурно-функціональну організацію організмів і вірусів, включаючи і вторинні структури. По-друге, функціональна активність промоторів включає дуже широкий спектр різноманітних функцій, таких як зв'язування реплікази, впізнавання матриці, ініціація чи стимуляція транскрипції, взаємодія вірусної РНК з власними та клітинними регуляторними факторами, репродукція вірусу, інфекційність тощо [8, 9]. Оскільки для різних функцій, очевидно, потрібні зовсім різні первинні та/або вторинні структурні елементи [10, 11], вираз «більш важлива роль вторинних структур, а не первинних послідовностей у забезпеченні функціональної активності субгеномних промоторів» потребує конкретизації як вторинної структури, так і її функції.

Властивості виявлених нами трьохкомпонентних нуклеотидних блоків: локалізація перед стартовим кодоном трансляції, наявність АУ-багатих ділянок після стартової точки транскрипції субгеномних РНК та збіжність позицій СТТ з позиціями 6-го нуклеотиду центрального мотиву, свідчать про їх причетність до ініціації транскрипції.

Встановлена нами наявність АУ-багатої ділянки після стартової точки транскрипції субгеномних РНК, яка сприяє розплітання двохланцюгових нуклеїнових кислот, спонукає дослідити можливість синтезу сГ РНК тобамовірусів на двохланцюгових матрицях, що вже встановлено у інших видів вірусів [12, 13].

Виявлена нами аномальна локалізація стартової точки транскрипції субгеномної РНК гена ТБ вірусу кільцевої плямистості одонтоглоссума (у позиції +7 відносно стартового кодона трансляції цього гена) може мати наступні причини: 1) трансляція гена ТБ може починатись з неканонічного стартового кодона поблизу початкової позиції гена, поданої в анотації геномного сиквенса (4814); 2) синтез транспортного білка може починатись не з першого кодона AUG через його відсутність у субгеномній РНК; 3) СТТ субгеномної РНК може бути в позиції -274, а не в +7; 4) транспортний білок вірусу може синтезуватись не з субгеномної РНК, а шляхом внутрішнього зв'язування рибосом сайтами IRES геномної РНК [14]. У випадку 2 трансляція транспортного білка може починатись у позиції 4886 з другого кодону AUG у кодувальній рамці і синтезувати продукт, коротший на 24 амінокислоти ($4886-4814=72$, $72/3=24$). Щодо випадку 3 варто зазначити, що в промоторній зоні гена ТБ виявляються два ТНБ, один з яких має високу збіжність з консенсусом (16 нк із 19), але аномальну локалізацію (+7), інший – нормальну локалізацію (-274), але

низьку збіжність нуклеотидів (13/19), за якої у промоторах тобамовірусів ми виявляли до 6 додаткових ТНБ. За збіжності з консенсусом, більшої за 13, у субгеномних промоторах всіх вірусів виявляються лише по одному ТНБ. Отже, більш ймовірною позицією локалізації ТНБ гена ТБ Вірусу кільцевої плямистості одонтоглоссума можна вважати позицію +7 відносно стартового кодона трансляції цього гена.

В нашій роботі було використано геномні сиквенси 17-ти штамів ВТМ і 21-го виду інших тобамовірусів, виділених з рослин 8-ми родин (Гарбузових, Кактусових, Мальвових, Орхідних, Пасифлорових, Пасльонових, Подорожникових, Хрестоцвітих) в 15-ти регіонах світу: Австралії, Англії, Іспанії, Казахстані, Китаї, Кореї, Новій Зеландії, Новій Гвінеї, Перу, Сінгапурі, США, Росії, Тайвані та Японії. Незважаючи на велике різноманіття штамів і видів вірусів, рослин-хазяїв, а також географічних, кліматичних та екологічних умов регіонів, досліджені тобамовіруси чітко розподіляються на 4 названі нами групи за подібністю консервативних елементів у субгеномних промоторах генів ТБ і БО.

Найбільша група (St10) включає Вірус плямистості болгарського перцю (19) та 10 штамів ВТМ (u1, im, x1, ks, ch1, ch2, ch3, pet, ch, b9), виділених з рослин тютюну, болгарського перцю, петунії, бальзаміну або віки в Європі, Кореї або Китаї. Група Tb5 містить Вірус мозаїки томатів, томатний штам ВТМ (tsL), атенуйований мутант штаму tsL, отриманий в Китаї (chm), а також штамми k1 і k2, виділені в Казахстані. Групу Cг6 утворюють: штам ВТМ, що вражає рослини родини Хрестоцвітих, виділений в Росії, а також 5 тобамовірусів хрестоцвітих рослин, виділених в Японії, США, Великобританії, Китаї та Іспанії з рослин турнепсу, китайської ріпи або йокаї: Тобамовірус хрестоцвітих штам Wasabi (вірус 6), Вірус посвітління жилок турнепсу (9), Тобамовірус хрестоцвітих (некласифікований, 15), Вірус мозаїки китайської ріпи (16), Вірус мозаїки йокаї (17). До групи Sob відносяться шість тобамовірусів, виділених в Австралії, Нідерландах або Японії, які інфікують рослини родини Пасльонових: Вірус м'якої зеленої мозаїки тютюну (1), Вірус м'якої плямистості перцю (3), Вірус мозаїки томатів (5), Вірус перцю обуда (10), Вірус м'якої плямистості бругмансії (14), Вірус плямистості болгарського перцю (19). Віруси рослин родини гарбузових: Вірус зеленої плямистої мозаїки огірка (2), Вірус м'якої плямистості плодів огірка (7), Вірус зеленої плямистої мозаїки цукіні (11), Вірус зеленої плямистої мозаїки кіури (12), виділені в Ізраїлі, Кореї чи Японії, утворюють групу Cu4.

Виявлені нами групи споріднених вірусів, які включають представників різних видів і штамів, виділених у різних регіонах планети з рослин різних родин, але мають подібні консервативні нуклеотидні мотиви чи заміни нуклеотидів, нагадують гомологічні ряди Н. І. Вавилова – групи різних видів і сортів рослин, що мають подібні морфологічні ознаки [15]. Гомологічні ряди нагадує також формування чітких кластерів на філогенетичних деревах за наявності гомологічних сайтів нуклеотидних чи амінокислотних послідовностей у дослідних вірусів. Причиною утворення таких груп, рядів і кластерів може бути обмежена можливість фіксації нуклеотидних замін через сумісне існування багатьох генетичних кодів у одній клітині [15, 16, 17], які детермінують тонко збалансований синтез вірусних і клітинних компонентів за часом, місцем, послідовністю,

швидкістю та кількістю. Оскільки сумісне існування різних генетичних кодів, очевидно, є наслідком дуже тривалої коєволюції вірусу і хазяїна (симбіогенезу), споріднені віруси повинні мати подібні не лише генетичні детермінанти та спадкові ознаки, а також і подібні заміни нуклеотидів, які не порушують тонко збалансованого функціонування генетичних кодів симбіонтів.

З'ясування молекулярних механізмів гомологічних рядів Вавилова на сьогодні обмежується кількома роботами, присвяченими дослідженням варіацій білків мейозу [18], рідких заміщень амінокислот [19], а також аналізу на генному рівні ознак розсіювання-утримання зерна в колосках і періодичності та тривалості цвітіння рослин [20]. Ці дослідження, проведені на моделі еукаріотичних організмів, показують наявність у них паралельної мінливості на молекулярно-генетичному рівні. Про таку мінливість свідчать також виявлені нами групи вірусів з однаковими замінами нуклеотидів, які придатні як модельні об'єкти для вивчення молекулярних механізмів детермінації гомологічних серій спадкової мінливості та паралельних мутацій.

КОНСЕРВАТИВНЫЕ НУКЛЕОТИДНЫЕ МОТИВЫ И ВТОРИЧНЫЕ СТРУКТУРЫ В ПРОМОТОРАХ СУБГЕНОМНЫХ РНК ТОБАМОВИРУСОВ

А.Н. Кириченко, И.С. Щербатенко

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

Резюме

Цель. Учитывая фрагментарность экспериментальных данных и противоречивость мнений относительно роли первичных и вторичных структур РНК в активности субгеномных (сг) промоторов, целью нашей работы было выявление и сравнение свойств консервативных нуклеотидных мотивов и стеблевых петель в сг промоторах двух генов 38-ми тобамовирусом. **Методы.** Геномные сиквенсы 17-ти штаммов ВТМ и 21 штамма других видов тобамовирусом были загружены из ГенБанка (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Поиск и сравнительный анализ консервативных компонентов промоторов проводили по полученным нами одноцепочечным разверткам стеблевых петель и консенсусной последовательности мотивов трехкомпонентного нуклеотидного блока (ТНБ), используя собственные узкоспециализированные компьютерные программы. **Результаты.** Установлено, что все 76 исследованных сг промоторов 2-х генов 38-ми тобамовирусом содержат консервативные ТНБ, которые выявляются в сиквенсах минус-цепочек геномных РНК с помощью консенсусной последовательности SSSSSnnnnnC YAAGCWWWnnWWWWW, где SSSSS – GC-богатый мотив, nnnnn и nn – произвольные (неконсенсусные) нуклеотиды, CYAAGCWWW – центральный мотив, WWWWW – AU-богатый мотив, Y – нуклеотид С или U. Идентичность консенсусной последовательности мотивов ТНБ штаммов ВТМ составляет 99,5%; мотивов ТНБ других видов тобамовирусом – 88,3%, а идентичность нуклеотидов стеблевых петель SL1, SL2 и SLcp соответствующим петлям ВТМ-U1 – 74,4%, 75,7% и 60,3% соответственно. 75 из 76 исследованных

ТНБ в шестой позиции центрального мотива содержат нуклеотид С, геномные позиции которого соответствуют стартовым точкам транскрипции (СТТ) сг РНК. СТТ обоих генов всех тобамовирусов локализованы перед стартовыми кодоном трансляции, за исключением гена транспортного белка Вируса кольцевой пятнистости одонтоглоссума. Исследованные нами тобамовирусы четко распределяются на 4 группы по сходству консервативных мотивов и замен нуклеотидов в субгеномных промоторах. **Выводы.** Результаты проведенных исследований противоречат предположению о более важной роли вторичных структур, а не первичных нуклеотидных последовательностей в функциональной активности сг промоторов тобамовирусов. Выявленная нами локализация АU-богатых мотивов после стартовых кодонов транскрипции сг РНК свидетельствуют о возможности синтеза тобамовирусных РНК на двухцепочечных матрицах. Найденные нами группы штаммов и видов тобамовирусов с идентичными или подобными нуклеотидными сайтами и заменами нуклеотидов дополняют ограниченный на сегодня перечень проявлений гомологических рядов Н.И.Вавилова на молекулярном уровне, а также согласуются с нашим предположением о молекулярном механизме гомологических рядов – возможностью фиксации только тех нуклеотидных замен, которые не нарушают тонко сбалансированного функционирования нескольких генетических кодов в одной клетке.

Ключевые слова: тобамовирусы, субгеномные промоторы, консервативные нуклеотидные мотивы и вторичные структуры, гомологические ряды изменчивости вирусов.

CONSERVE NUCLEOTIDE MOTIFS AND SECONDARY STRUCTURES WITHIN TOBAMOVIRUS SUBGENOMIC PROMOTERS

A.N. Kyrychenko, I.S. Shcherbatenko

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

Aim. Considering the restriction of experimental data and the inconsistency of opinions regarding the role of primary and secondary RNA structures in the activity of subgenomic (sg) promoters, the aim of the work was to search a conservative base motifs and stem-loops in tobamoviral sg promoters and compare their properties. **Methods.** The complete genomic sequences of 17 TMV strains and 21 strains of other tobamovirus species were downloaded from the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A computer search and comparative analysis of conservative promoter components was carried out using the consensus sequence of three-component nucleotide blocks (TNBs), linear sequences of unfolded stem-loops and a set of own tightly specialized computer programs. **Results.** A highly conserved TNBs were found in all of 76 tobamoviral sg promoters tested using the consensus sequence SSSSnnnnnCYAAGCWWW-nnWWWWW, were SSSSS – GC-rich motif, nnnnn and nn – arbitrary (not-consensus) nucleotides, CYAAGCWWW – central motif, WWWWW – AU-rich motif, Y – nucleotide C or U. The identity of TNB motifs to consensus sequence consists 99.5% and 88.3%. for TMV strains and other tobamoviruses, respectively. The nucleotide coincidence of SL1, SL2 and SLcp stem-loops with the corresponding TMV-U1 loops is 74.4, 75.7 and 60.3%, respectively. All 75 of the 76

TNBs examined in this study contain a nucleotide C, in the sixth position of central motif. Genomic positions of the nucleotide correspond to the transcription start site (TSS) of sg RNAs. The TSSs of both genes of all but one tobamoviruses are localized upstream of the translation start codons. The TSS of the *Odontoglossum ringspot virus* movement protein gene is localized downstream of the TSS. The tobamoviruses studied are clearly divided into 4 groups according to the similarity of conservative motifs and nucleotide substitution in subgenomic promoters. **Conclusions.** The results of the studies contradict the assumption about more important role of secondary structures than primary nucleotide sequences in the functional activity of tobamovirus sg promoters. Localisation of AU-rich motifs downstream of the sg RNA TSS suggests the possibility of tobamovirus RNA synthesis on double-strand matrixes. The groups of tobamoviruses containing different strains and species with similar nucleotide substitutions supplement a limited demonstrations of Vavilov's homologous series at the molecular level, and are also consistent with our assumption about the molecular mechanism of homologous series – the possibility of fixing only those nucleotide substitutions that do not disturb of finely balanced functioning of several genetic codes in one cell.

Keywords: tobamoviruses, subgenomic promoters, conservative nucleotide motifs and secondary structures, homologous series of virus variability.

1. Adams MJ, Antoniw JF, Kreuze J. Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. Arch. Virol. 2009; 154:1967–72.
2. Goelet P, Lomonosoff GP, Butler PJG, Akam ME, Gait MJ, Karn J. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982; 79:5818–22.
3. Grdzlishvili VZ, Chapman SN, Dawson WO, Lewandowski DJ. Mapping of the tobacco mosaic virus movement protein and coat protein subgenomic RNA promoters in vivo. Virology. 2000; 275:177–92.
4. Watanabe Y, Meshi T, Okada Y. The initiation site for transcription of the TMV 30-kDa protein messenger RNA. FEBS Lett. 1984; 173:247–50.
5. Lehto K, Grantham GL, Dawson WO. Changing the start codon context of the 30K gene of tobacco mosaic virus from “weak” to “strong” does not increase expression. Virology. 1990; 174:145–57.
6. Shcherbatenko IS. Graphical visualization of the biologically significant segments in the sequence sets of the relative plant viruses. Microbiol. Zh. 2012; 74:108–15.
7. Gordejchuk OI, Oleshchenko LT, Shcherbatenko IS. [Similar nucleotide blocks in tobamoviral subgenomic promoters]. Microbiol. Zh. 2007; 69:42–51. Ukrainian.
8. Gunawardene CD, Jaluba K, White KA. Conserved motifs in a tombusvirus polymerase modulate genome replication, subgenomic transcription, and amplification of defective interfering RNAs. J Virol. 2015; 89:3236–46.
9. Yuan X, Shi K, Simon AE. A local, interactive network of 3' RNA elements supports translation and replication of Turnip crinkle virus. J Virol. 2012; 86:4065–81.
10. Tilgner M, Shi PY. Structure and function of the 3' terminal six nucleotides of the west Nile virus genome in viral replication. J Virol. 2004; 78:8159–71.
11. Man M, Epel BL. Characterization of regulatory elements within the coat protein (CP) coding region of Tobacco mosaic virus affecting subgenomic transcription and green fluorescent protein expression from the CP subgenomic RNA promoter. J Gen Virol. 2004; 85:1727–38.

12. Kovalev N, Pogany J, Nagy PD. Template role of double-stranded RNA in tombusvirus replication. *J Virol.* 2014; 88:5638–51.
13. Osman TA, Olsthoorn RC, Livieratos IC. In vitro template-dependent synthesis of Pepino mosaic virus positive- and negative-strand RNA by its RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Res.* 2012;167:267–72.
14. Dorokhov YL, Skulachev MV, Ivanov PA, Zvereva SD, Tjulkina LG, Merits A, Gleba YY, Hohn T, Atabekov JG. Polypurine (A)-rich sequences promote cross-kingdom conservation of internal ribosome entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:5301–06.
15. Itzkovitz S, Alon U. The genetic code is nearly optimal for allowing additional information within protein-coding sequences. *Genome Res.* 2007; 17:405–12.
16. Cohan AB., Haran TE. The coexistence of the nucleosome positioning code with the genetic code on eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37:6466–76.
17. Forman JJ, Coller HA. The code within the code: MicroRNAs target coding regions. *Cell Cycle.* 2010; 9:1533–41.
18. Bogdanov IF. [Variation and evolution of meiosis]. *Genetika.* 2003; 39(4):453–73. Russian.
19. Rogozin IB, Thomson K, Csürös M, Carmel L, Koonin EV. Homoplasy in genome wide analysis of rare amino acid replacements: the molecular-evolutionary basis for Vavilov's law of homologous series. *Biol Direct.* 2008; 3:7. doi: 10.1186/1745-6150-3-7.
20. Folta KM. Molecular-genetic extensions of Vavilov's predictions. *HortScience.* 2015; 50:777–79.

Отримано 31.07.2018