

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2021.05.107>

УДК 577.112:66.094.533]:581.16:632.38

Л.О. Максименко

Н.Й. Пархоменко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

E-mail: : maksymenko.l.a@gmail.com

Фосфорилування вірусних білків — важлива умова репродукції рослинних вірусів

Представлено членом-кореспондентом НАН України Б.П. Мацелюхом

*Фосфорилування білків характерно для структурних білків у вірусу мозаїки цвітної капусти, А-вірусу картоплі (АВК), вірусу шарки сливи та ін. Цей процес необхідний для розвитку вірусної інфекції в рослині. Х-вірус картоплі (ХВК) — типовий представник роду *Rotavirus*. Встановлено, що капсидний білок ХВК здатний фосфорилуватися в стандартному інкубаційному середовищі *in vitro*, яке містило (гамма-³²P)АТФ. На відміну від цього білок ХВК у стандартному інкубаційному середовищі за наявності (альфа-³²P)АТФ не фосфорилується. Таким чином, кінцевий фосфат АТФ відіграє головну роль у фосфорилуванні білка ХВК. Фосфорильований білок ХВК у системі *in vitro* був виявлений шляхом експонування нітроцелюлозного фільтра з імуноблотом на рентгенівській плівці РМ-1. У результаті був одержаний автограф фосфорильованого *in vitro* структурного білка ХВК. Концентрація іонів Ca^{2+} та ЕДТА у системі фосфорилування *in vitro* впливає на процес фосфорилування структурного білка ХВК. За наявності в системі фосфорилування *in vitro* 10 мМ ЕДТА та 10 мМ $CaCl_2$ процес фосфорилування структурного білка ХВК пригнічується. Явище фосфорилування структурного білка ХВК використовується в процесах репродукції вірусу в інфікованій клітині.*

Ключові слова: Х-вірус картоплі, капсидний білок ХВК, фосфорилування, протеїнкінази.

У науковій літературі описано фосфорилування структурних білків у вірусу мозаїки цвітної капусти, А-вірусу картоплі (АВК), вірусу шарки сливи та ін. [1–3]. Оскільки фосфорильовані білки беруть участь у регуляції більшості процесів усередині клітин, слід чекати, що вірусні білки здатні фосфорилуватись і дефосфорилуватись у ході розвитку інфекції.

Великий інтерес становить вивчення молекулярних механізмів регуляції процесів трансляції і реплікації вірусних РНК рослин. Показано, що білок оболонки вірусу шарки сливи у складі вірусної частки не здатен піддаватися фосфорилуванню, а виділений вільний білок — здатний [1]. Фосфорилування вільного білка оболонки регулює кількість

Цитування: Максименко Л.О., Пархоменко Н.Й. Фосфорилування вірусних білків — важлива умова репродукції рослинних вірусів. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2021. № 5. С. 107–113.
<https://doi.org/10.15407/dopovidi2021.05.107>

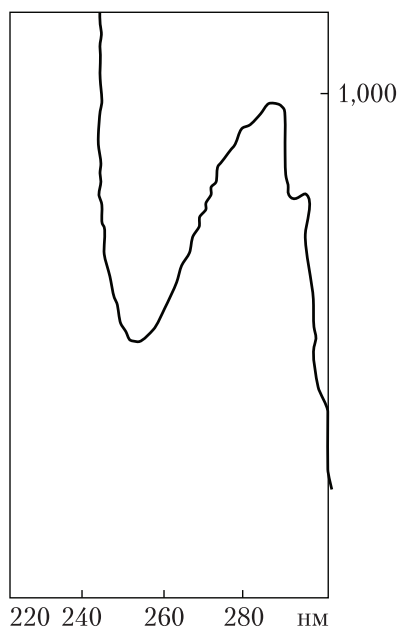


Рис. 1. УФ-спектр структурного білка ХВК при 280 нм

жували після центрифугування при 10000 г протягом 15 хв і розчиняли у фосфатному буфері, рН 7,0. Концентрацію вірусу визначали на спектрофотометрі Spеcоrd при довжині хвилі 260 нм в УФ-світлі за формулою: $c = (\text{пік} \cdot \text{розведення}) / 2,7$ [5]. Білок оболонки ХВК одержували за методом [6]. Кролячу антисироватку до білка ХВК одержували, імунізуючи кроля внутрішньовенно через кожні 7 діб протягом місяця. Потім через 10 діб відбирали кров і відділяли сироватку. Титр сироватки визначали методом подвійної дифузії в 1 %-му агарі [7]. Фосфорилування білка ХВК *in vivo* визначали таким чином. Зрізані листя дурману, уражені ХВК зі специфічними симптомами, занурювали в дистильовану воду, що містила 375 мКі ортофосфату ^{32}P , накривали склом і інкубували протягом 5 діб, поки листя повністю всмоктало воду з міткою. Після цього з листя виділяли ХВК, фракціонували білок методом електрофорезу в ПААГ, білки з гелю переносили контактним чином на нітроцелюлозний фільтр і проводили імуноблот за методом Towbin [8]. Для цього використовували сироватку, одержану до білка оболонки ХВК, і антикролячі антитіла, мічені пероксидазою.

Кіназну активність досліджуваних білків *in vitro* визначали за методом Menissier-De Murcia [9]. Готували таку реакційну суміш: 20 мМ *trис*-HCl, рН 7,4; 10 мМ MnCl_2 , 0,8 мМ EDTA і 2 мКі ^{32}P АТФ (ємність 3000 Кі/мМ). Для фракціонування білків у ПААГ до зразків додавали ТХО, кінцева концентрація якої становила 10 %. До осаду білка додавали дисоціюючий буфер, нагрівали при 100 °С 5 хв і наносили на 8–20 %-й градієнтний ПААГ. Проводили електрофорез за методом Laemmli [10]. Фосфорильовані *in vitro* і *in vivo* білки виявляли методом радіоавтографії на плівці РМ-1. З цією метою висушений гель, або нітроцелюлозний фільтр експонували на плівці протягом 12 год.

Результати. Одержаний нами розчин білка оболонки ХВК вимірювали на спектрофотометрі. На рис. 1 зображено спектр поглинання білка в УФ-світлі при 280 нм. Методом

білка, здатного взаємодіяти з РНК [2]. На пізніх стадіях інфекції він дефосфорилується і активує процес утворення вірусних часток [3].

РНК Х-вірусу картоплі (ХВК) у складі вірусних часток недоступна для трансляції *in vitro*, але набуває здатності транслюватися в результаті фосфорилування білка оболонки [4]. У зв'язку з цим метою нашого дослідження було вивчити умови фосфорилування капсидного білка ХВК у системах *in vitro* і *in vivo*, а також впливу EDTA та CaCl_2 на фосфорилування вірусного білка в системі *in vitro*.

Матеріали і методи. ХВК одержували з листя *Datura stramonium* з характерними симптомами інфекції. До гомогенату листя додавали до 3 об'ємів натрій-фосфатного буфера, рН 8,0, який містив 0,2 % меркаптоетанолу. Фільтрат центрифугували при 3000 г протягом 10 хв. Супернатант центрифугували ще 10 хв при 10000 г. Далі до рідини додавали тритон Х-100 до 0,5 % і інкубували суміш 30 хв. Вірус осаджували за допомогою ПЕГ 6000, доводячи його до кінцевої концентрації 4,5 % і NaCl до 2 %.

Осад вірусу одержували після центрифугування при 10000 г протягом 15 хв і розчиняли у фосфатному буфері, рН 7,0. Концентрацію вірусу визначали на спектрофотометрі Spеcоrd при довжині хвилі 260 нм в УФ-світлі за формулою: $c = (\text{пік} \cdot \text{розведення}) / 2,7$ [5]. Білок оболонки ХВК одержували за методом [6]. Кролячу антисироватку до білка ХВК одержували, імунізуючи кроля внутрішньовенно через кожні 7 діб протягом місяця. Потім через 10 діб відбирали кров і відділяли сироватку. Титр сироватки визначали методом подвійної дифузії в 1 %-му агарі [7]. Фосфорилування білка ХВК *in vivo* визначали таким чином. Зрізані листя дурману, уражені ХВК зі специфічними симптомами, занурювали в дистильовану воду, що містила 375 мКі ортофосфату ^{32}P , накривали склом і інкубували протягом 5 діб, поки листя повністю всмоктало воду з міткою. Після цього з листя виділяли ХВК, фракціонували білок методом електрофорезу в ПААГ, білки з гелю переносили контактним чином на нітроцелюлозний фільтр і проводили імуноблот за методом Towbin [8]. Для цього використовували сироватку, одержану до білка оболонки ХВК, і антикролячі антитіла, мічені пероксидазою.



Рис. 2. Фосфорилування білка ХВК *in vitro* (радіоавтографія): 1 — фосфорильований білок ХВК у стандартному інкубаційному середовищі з додаванням (гамма- ^{32}P)АТФ; 2 — нефосфорильований білок ХВК з додаванням (альфа- ^{32}P)АТФ

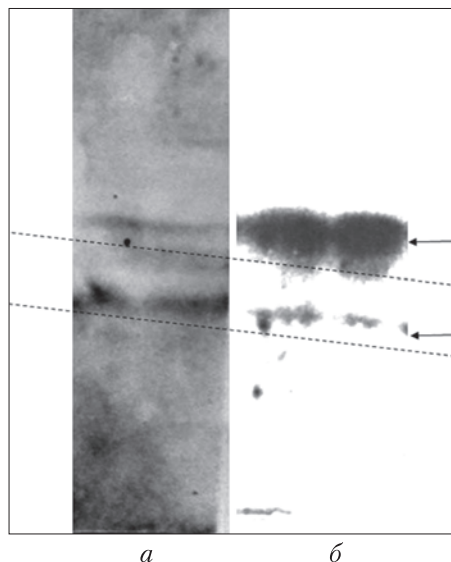


Рис. 3. Фосфорилування білка ХВК *in vivo*: а — імуноблот з використанням сироватки, одержаної до білка ХВК; б — радіоавтографія фосфорильованого вірусного білка (стрілками вказано білок ХВК та продукти протеолізу)

електрофорезу в 10 %-му ПААГ було визначено молекулярну масу білка ХВК, що відповідала 29 кД.

20 мкл розчину білка ХВК вносили в стандартне реакційне середовище, яке містило (гамма- ^{32}P)АТФ і (альфа- ^{32}P)АТФ. Продукти фосфорилування ретельно відмивали від мітки, фракціонували в ПААГ, гель висушували і експонували на рентгенівській плівці. Як випливає з аналізу автографа, білок ХВК фосфорильовувався в системі *in vitro*, що містила (гамма- ^{32}P)АТФ (рис. 2, 1), і не фосфорильовувався в системі, яка містила (альфа- ^{32}P)АТФ (рис. 2, 2). Таким чином, білок ХВК здатний фосфорильовуватися в системі *in vitro*, що містить (гамма- ^{32}P)АТФ. Маючи такі властивості, білок оболонки ХВК, мабуть, бере участь у регуляції синтезу білків у інфікованій клітині. На рис. 3 наведено автограф фосфорилування білка ХВК у системі *in vivo*. Автограф одержували після експонування на рентгенівській плівці нітроцелюлозного фільтра після проведеного імуноблоту із застосуванням сироватки, одержаної до покривного білка ХВК. Таким чином, білок ХВК здатний фосфорильовуватися в інфікованих ХВК листях дурману. Треба зазначити, що поряд з фосфорилуванням вірусного білка, фосфорильовуються і продукти його протеолізу, який здійснюється в клітинах рослин протеазами.

Вірусні білки, потрапляючи в клітину, можуть піддаватися фосфорилуванню—дефосфорилуванню клітинними кіназами та фосфатазами, і віруси можуть використовувати ці процеси в ході розвитку інфекції. Геноми більшості рослинних вірусів не кодують власних протеїнкіназ. У рослинній клітині існують кальцієзалежні протеїнкінази, циклінзалежні протеїнкінази. Циклінзалежні кінази беруть участь у регуляції клітинного циклу. Крім того, їх активність регулюється шляхом фосфорилування—дефосфорилування. У зв'язку з цим

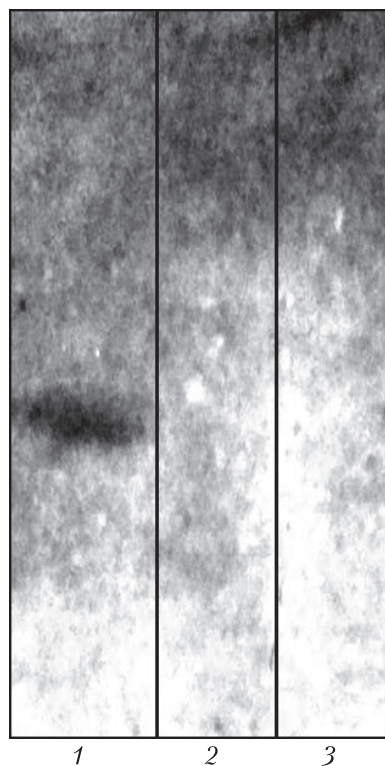


Рис. 4. Вплив ЕДТА і CaCl_2 на фосфорилування білка ХВК у системі *in vitro*: 1 – білок ХВК фосфорилується; 2 – білок ХВК +10 мМ ЕДТА – не фосфорилується; 3 – білок ХВК+10 мМ CaCl_2 – не фосфорилується

наступним нашим завданням було дослідити вплив хелатуючих агентів (ЕДТА), а також іонів Ca^{2+} на процес фосфорилування структурного білка ХВК. З цією метою в стандартну інкубаційну суміш, яка містила (гамма- ^{32}P)АТФ вносили в одному випадку ЕДТА до кінцевої концентрації 10 мМ, а в іншому – 10 мМ CaCl_2 . Потім до проб додавали по 20 мкл розчину вірусного білка в концентрації 1 мг/мл, інкубували як зазначено вище, проводили електрофорез в 10 %-му ПААГ, гель висушували і експонували на рентгеновській плівці РМ-1. Одержаний автограф вірусного білка в стандартному середовищі (рис. 4, доріжка 1) і відсутність фосфорилування білка ХВК свідчать про те, що за наявності в системі *in vitro* 10 мМ ЕДТА (рис. 4, доріжка 2) та 10 мМ CaCl_2 (рис. 4, доріжка 3) пригнічується процес фосфорилування білка оболонки ХВК.

Обговорення результатів. Фосфорилування – процес перенесення кінцевої фосфатної групи від АТФ на відповідний залишок серину або треоніну. Цей процес здійснюють протеїнкінази. Ці ферменти різні за субстратною специфічністю і за механізмами регуляції їх активності. Існує цілий ряд активаторів протеїнкіназ – циклічний аденозинмонофосфат (цАМФ), іони кальцію, магнію, марганцю, двоспіральна РНК та ін. [3].

На сучасному етапі розвитку вірусології рослин великий інтерес становить вивчення молекулярних механізмів регуляції процесів трансляції і реплікації вірусних РНК. Авторами роботи [11] була запропонована модель, згідно з якою в інфікованій клітині білок оболонки фосфорилується кіназами рослини-хазяїна і вірусна РНК стає доступною для трансляції. В подальшому циклі розмноження вірусу РНК “одягається” білком оболонки і тимчасово виключається з процесів трансляції, реплікації і проходить по плазмодесмах у сусідні клітини. Можливо, саме фосфорилування відповідає за руйнування реплікативного комплексу.

Можна припустити, що на середніх і пізніх стадіях інфекції настає пригнічення протеїнкіназної активності в ХВК заражених клітинах, що сприяє формуванню зрілих віріонів. Відомо, що протеїнкінази тотального екстракту листя тютюну здатні фосфорилувати білок оболонки АВК, а також транспортний білок ВТМ. Обидві кіназні реакції не залежали від іонів Ca^{2+} і активувались іонами Mn^{2+} ефективніше, ніж іонами Mg^{2+} [1, 4]. Можливий механізм стимуляції протеїнкіназ двовалентними катіонами металів полягає в утворенні комплексу цих катіонів з АТФ і подальшому використанні ферментом цього комплексу [1].

Автори роботи [12] показали, що зв'язування РНК ВТМ з транспортним білком призводить до пригнічення її трансляції *in vitro*. Було зроблено припущення, що *in vivo* акти-

вація комплексу транспортний білок—РНК відбувається в ході його проходження через плазмодесми і здійснюється шляхом фосфорилування транспортного білка.

Раніше нами у складі мРНП (інформосом) виявлені фосфорильовані *in vitro* білки, індуковані ХВК у рослинах дурману. У вірусспецифічних інформосомах був виявлений білок із цАМФ-залежною протеїнкіназною активністю. Цей білок є РНК-залежною РНК-полімеразою і здатний направляти в системі реплікації *in vitro* синтез дволанцюгової РНК [13]. Є відомості про роль фосфорильованого капсидного білка АВК в ініціації трансляції вірусної РНК, а також його взаємозв'язок з РНК-залежною РНК-полімеразою [14]. Для трьох груп вірусів показано фосфорилування білків-компонентів РНК-залежної РНК-полімерази [2, 13, 14,]. Є також дані про фосфорилування *in vivo* капсидного білка ВТМ [15].

Таким чином, у різних вірусів рослин структурні білки можуть бути поліфункціональними і використовувати для цього процесу фосфорилування—дефосфорилування. Фосфорилування вірусних білків є важливою умовою репродукції рослинних вірусів. Ми показали, що білок оболонки ХВК також здатний фосфорилуватися в системах *in vitro* і *in vivo*. Отримані нами результати підтверджують дані літератури.

Висновки. 1. Білок оболонки ХВК здатний фосфорилуватися в стандартному інкубаційному середовищі *in vitro*, яке містить (гамма-³²Р)АТФ. На відміну від цього, білок ХВК у стандартному інкубаційному середовищі за наявності (альфа-³²Р)АТФ не фосфорилується. Таким чином, кінцевий фосфат АТФ відіграє головну роль у фосфорилуванні білка ХВК.

2. Білок ХВК здатний фосфорилуватись в інфікованих листях дурману.

3. За наявності в системі фосфорилування *in vitro* 10 мМ ЕДТА та 10 мМ CaCl₂ процес фосфорилування капсидного білка ХВК пригнічується.

Отже, явище фосфорилування білка оболонки ХВК, безумовно, використовується в процесах репродукції вірусу в інфікованій клітині.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

- Ivanov K.I., Puustinen P., Merits A., Saarna M., Makinen K. Phosphorylation down-regulates the RNA binding function of the coat protein of potato virus A. *J. Biol. Chem.* 2001. **276**. P. 13530—13540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009551200>
- Law L.M., Everitt J.C., Beatch M.D., Holmes C.F., Hobman T.C. Phosphorylation of rubella virus capsid regulates its RNA binding activity and virus replication. *J. Virol.* 2003. **77**. P. 1764—1771. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.1764-1771.2003>
- Makarov V.V., Iconnicova A.Y., Guseinov M.A., Vishnichenko V.K., Kalinina N.O. *In vitro* phosphorylation of the N-terminal half of hordeivirus movement protein. *Biochemistry (Mosc.)* 2012. **77**. P. 1072—1081. <https://doi.org/10.1134/S0006297912090155>
- Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Novikov V.K., Arkhipenko M.V. Translational activation of encapsidated potato virus X RNA by coat protein phosphorylation. *Virology*. 2001. **286**. P. 466—474. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1013>
- Koenig H., Tremaine J.H., Shepard J.F. *In situ* degradation of the protein chain of potato virus X at the N- and C-termini. *J. gen. Virol.* 1978. **38**. P. 329—337. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-38-2-329>
- Wu G., Bruening G. Two proteins from cowpea mosaic virus. *Virology*. 1971. **46**, № 3. P. 596—612. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90063-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90063-8)
- Shepard J.F., Secor G.A. Detection of potato virus X in infected plant tissue by radial and double-diffusion tests in agar. *Phytopathology*. 1969. **59**, № 12. P. 1838—1844.

8. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. **76**, № 9. P. 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
9. Menissier-De Murcia J., Geldreich A., Lebeurier J. Evidence for a protein kinase activity associated with purified particles of cauliflower mosaic virus. *J. gen. Virol.* 1986. **67**. P. 1885–1891. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-9-1885>
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. **227**, № 5259. P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
11. Oparka K.J., Roberts A.G., Roberts I.M., Prior D.A.M., Santa Crus S. Viral coat protein is targeted to, but does not gate, plasmodesmata during cell-to-cell movement of potato virus X. *Plant J.* 1996. **10**. P. 805–813. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10050805.x>
12. Karpova O.V., Rodionova N.P., Ivanov K.I., Kozlovsky S.V., Dorokhov Yu.L., Atabekov I.G. Phosphorylation of tobacco mosaic virus movement protein abolishes its translation repressing ability. *Virology*. 1999. **261**. P. 20–24. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9842>
13. Диденко Л. Ф., Максименко Л. А., Пархоменко Н. И. Фосфорилирование *in vitro* белков информосома из листьев дурмана, инфицированного X-вирусом картофеля. *Микробиол. журн.* 1993. **55**, № 2. С. 68–74.
14. Fellers J., Wan J., Hong Y., Collins G.B., Hunt A.G. *In vitro* interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 1998. **79**. P. 2043–2049. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-8-2043>
15. Watanabe Y., Ogawa T., Okada Y. *In vivo* phosphorylation of the 30-kDa protein of tobacco mosaic virus. *FEBS Lett.* 1992. **313**. P. 181–184. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81440-w](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81440-w)

Надійшло до редакції 07.07.2021

REFERENCES

1. Ivanov, K. I., Puustinen, P., Merits, A., Saarma, M. & Makinen, K. (2001). Phosphorylation down-regulates the RNA binding function of the coat protein of potato virus X. *J. Biol. Chem.*, 276, pp. 13530-13540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009551200>
2. Law, L. M., Everitt, J. C., Beatch, M. D., Holmes, C. F. & Hobman, T. C. (2003). Phosphorylation of rubella virus capsid regulates its RNA binding activity and virus replication. *J. Virol.*, 77, pp. 1764-1771. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.1764-1771.2003>
3. Makarov, V. V., Iconnicova, A. Y., Guseinov, M. A., Vishnichenko, V. K. & Kalinina, N. O. (2012). *In vitro* phosphorylation of the N-terminal half of hordeivirus movement protein. *Biochemistry (Mosc.)*, 77, pp. 1072-1081. <https://doi.org/10.1134/S0006297912090155>
4. Atabekov, J. G., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., Novikov, V. K. & Arkhipenko, M. V. (2001). Translational activation of encapsidated potato virus X RNA by coat protein phosphorylation. *Virology*, 286, pp. 466-474. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1013>
5. Koenig, H., Tremaine, J. H. & Shepard, J. F. (1978). *In situ* degradation of the protein chain of potato virus X at the N- and C-termini. *J. gen. Virol.*, 38, pp. 329-337. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-38-2-329>
6. Wu, G. & Bruening, G. (1971). Two proteins from cowpea mosaic virus. *Virology*, 46, No. 3, pp. 596-612. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90063-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90063-8)
7. Shepard, J. F. & Secor, G. A. (1969). Detection of potato virus X in infected plant tissue by radial and double-diffusion tests in agar. *Phytopathology*, 59, No. 12, pp. 1838-1844.
8. Towbin, H., Staehelin T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, No. 9, pp. 4350-4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
9. Menissier-De Murcia, J., Geldreich, A. & Lebeurier, J. (1986). Evidence for a protein kinase activity associated with purified particles of cauliflower mosaic virus. *J. gen. Virol.*, 67, pp. 1885-1891. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-9-1885>
10. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, No. 5259, pp. 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

11. Oparka, K. J., Roberts, A. G., Roberts, I. M., Prior, D. A. M. & Santa Crus, S. (1996). Viral coat protein is targeted to, but does not gate, plasmodesmata during cell-to-cell movement of potato virus X. *Plant J.*, 10, pp. 805-813. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10050805.x>
12. Karpova, O. V., Rodionova, N. P., Ivanov, K. I., Kozlovsky, S. V., Dorokhov, Yu. L. & Atabekov, I. G. (1999). Phosphorylation of tobacco mosaic virus movement protein abolishes its translation repressing ability. *Virology*, 261, pp. 20-24. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9842>
13. Didenko, L. F., Maksymenko, L. A. & Parkhomenko, N. I. (1993). *In vitro* phosphorylation of informosome proteins from leaves of stramonium infected with potato X-virus. *Mikrobiol. Zhurn.*, 55, No. 2, pp. 68-74 (in Russian).
14. Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G. B. & Hunt, A. G. (1998). *In vitro* interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *J. gen. Virol.*, 79, pp. 2043-2049. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-8-2043>
15. Watanabe, Y., Ogawa, T. & Okada, Y. (1992). *In vivo* phosphorylation of the 30-kDa protein of tobacco mosaic virus. *FEBS Lett.*, 313, pp.181-184. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81440-w](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81440-w)

Received 07.07.2021

L.O. Maksymenko

N.Y. Parkhomenko

Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

PHOSPHORYLATION OF STRUCTURAL VIRAL PROTEINS – ESSENTIAL CONDITION FOR PLANT VIRUSES REPRODUCTION

Phosphorylation of proteins is characteristic for structural proteins of cauliflower mosaic virus, potato virus A (PVA), plum beetle virus, and others. This process is necessary for the development of viral infection in the plant. Potato virus X (PVX) is a typical member of the genus *Potexvirus*. It was found that the structural viral protein of potato virus X is able to phosphorylation in a standard incubation medium *in vitro*, which contained (gamma-³²P)ATP. In contrast, PVX protein in a standard incubation medium in the presence of (alpha-³²P)ATP is not phosphorylated. Thus, the final ATP phosphate plays a major role in the phosphorylation of the structural PVX protein. Phosphorylated PVX protein in the system *in vivo* was detected by exposing nitrocellulose with immunoblot on X-ray film PM-1. As a result, an autograph of the phosphorylated *in vivo* structural protein PVX was obtained. The concentration of Ca and EDTA ions in the *in vitro* phosphorylation system affects the process of phosphorylation of the structural protein of PVX.

The presence of 10 mM EDTA and 10 mM CaCl₂ in the *in vitro* phosphorylation system inhibited the phosphorylation process of the PVX structural protein. The phenomenon of phosphorylation of the structural protein of PVX is probably used in the processes of virus reproduction in an infected cell.

Keywords: potato X-virus, structural protein of PVX, phosphorylation, protein kinases.