



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.277 : 577.112.4

© 1990 г.

О. В. Морозова, Н. А. Белявская*, Л. Э. Матвеев,
Э. А. Кветкова*, А. Г. Плетнев

РЕПЛИКАТИВНЫЙ КОМПЛЕКС ВИРУСА
КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТАII*. ВЛИЯНИЕ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ Е И АНТИТЕЛ К НЕМУ
НА СИНТЕЗ РНК IN VITRO

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР;

* Омский институт природноочаговых инфекций МЗ РСФСР

В ядерных фракциях клеток, инфицированных вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) и способных синтезировать полноразмерные вирусные РНК in vitro, присутствуют 5 вирусоспецифических белков: р100 (NS5), р79, р69 (NS3), р55 (Е) и р50 [1]. Методом аффинной модификации реакционноспособными аналогами нуклеозид-5'-трифосфатов и иммуноанализом было показано, что белок NS5 необходим для инициации синтеза «минус»-цепи РНК ВКЭ на ранней стадии инфекции, а белок NS3 — для инициации синтеза вирионной мРНК на поздней стадии инфекции клеток ВКЭ. Роль других белков в репликации генома флавивирусов не выяснена. Участие структурного белка Е, присутствующего во фракции ядер с репликативной активностью, подвергается сомнению [2].

В настоящей работе нами исследовалось влияние белка Е, а также моно- и поликлональных антител к этому белку на РНК-зависимую репликацию генома ВКЭ in vitro. Методы выделения белка Е и репликативного комплекса ВКЭ описаны ранее [1, 3]. (Штаммы гибридных культивируемых клеток мыши *Mus musculus*, депонированные в Специализированной коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных Института цитологии АН СССР, имеют коллекционный номер ВСКК(П) 210Д, ВСКК(П)207Д, ВСКК(П)205Д.) Белок Е или антитела к нему добавляли в реакционную смесь, содержащую ядерную фракцию из инфицированных ВКЭ клеток СПЭВ, и проводили синтез РНК в присутствии NTP, один из которых был радиоактивно мечен. Анализ продуктов реакции осуществляли путем включения меченого субстрата в кислотонерастворимую фракцию и электрофорезом в агарозном геле с 2,2 М формальдегидом.

Результаты, приведенные на рис. 1, свидетельствуют о том, что добавление экзогенного белка Е существенно ингибирует синтез вирусных РНК, в то время как добавление поликлональных моноспецифических и моноклональных антител (МкАт) к белку Е в систему репликации РНК ВКЭ in vitro приводит к ярко выраженному стимулирующему эффекту. Следует отметить, что МкАт, продуцируемые гибридной 2Н3 и обла-

* Сообщение I см. [4].

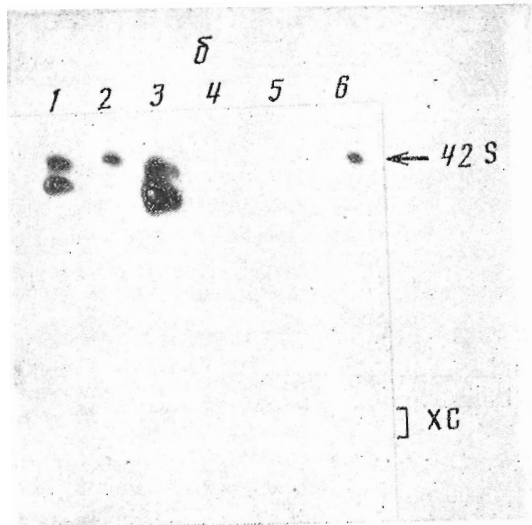
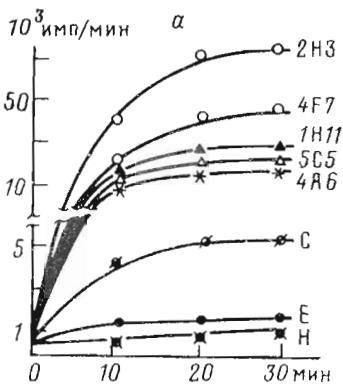


Рис. 1. Влияние структурного белка оболочки Е и антител к нему на РНК-зависимый синтез РНК ВКЭ *in vitro*. а — включение $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GMP}$ в кислотонерастворимый продукт. Синтез РНК проводили в условиях, описанных ранее [1], в присутствии ядерной фракции из незараженных (Н) и инфицированных ВКЭ клеток СПЭВ (фракции выделены после 45 ч инфекции, кривая С). В смеси С были добавлены: белок Е до концентрации 10 мкг/мл (кривая Е) или же моноклональные антитела к этому белку в разведении 1 : 1000 (кривые 4А6, 5С5, 1Н11, 4F7, 2Н3; маркировка кривых соответствует источнику МкАт). Смеси инкубировали 15 мин при 25° С и синтез РНК запускали добавлением трех NTP до концентрации каждого 0,5 мМ и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ до концентрации 10 мкМ (3000 Ки/ммоль). Аликвоты отбирали в указанное время, РНК осаждали трихлоруксусной кислотой, радиоактивность проб определяли как описано ранее [1]. б — радиоавтограмма электрофоретического разделения продуктов синтеза РНК в 1% агарозном геле с 2,2 М формальдегидом. Перед началом синтеза РНК к фракции ядер из инфицированных ВКЭ клеток СПЭВ в буфере для репликации [1] добавляли белок Е (1 мкг/мл) или МкАт, секретируемые гибридомой 2Н3, в разведении 1 : 1000 (дорожки 2 и 3 соответственно), или поликлональные антитела к белку NS3 в разведении 1 : 100 (дорожка 4) и белку NS5 в разведении 1 : 100 (дорожка 5), или равный объем воды (дорожка 1). Смеси инкубировали 15 мин при 25° С, затем добавляли $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, АТР, УТР и СТР в концентрациях 0,5 М. Смеси инкубировали 30 мин при 30° С, добавляли формальдегид до концентрации 2,2 М, фосфатный буфер, рН 7,0, до 20 мМ и ксилолцианоловый краситель (ХС) до 0,02%. Пробы прогревали 15 мин при 56° С и проводили электрофорез; в качестве маркера длины использовали вирусную РНК ВКЭ (42S), которую выявляли блот-гибридизацией с ^{32}P -мечеными фрагментами кДНК ВКЭ [1]

дающие свойством преципитации вирионов ВКЭ в агаре, наиболее эффективно стимулируют синтез вирусоспецифичной РНК. Электрофоретический анализ продуктов РНК-зависимого синтеза РНК показал (рис. 1, б), что репликация усиливается в присутствии антител к белку оболочки Е (дорожка 3), а добавление антител к белку NS3 или NS5 (дорожки 4 и 5 соответственно) блокирует эту реакцию. Кроме того, влияние структурного белка Е на репликативный комплекс, выделенный через 8 ч постинфекции, выражено слабее, чем на репликативный комплекс, выделенный через 45 ч после заражения (данные не приведены). По-видимому, это влияние высокоспецифично в отношении репликативного комплекса ВКЭ, поскольку добавление белка Е ВКЭ в реакционные смеси, содержащие ДНК-зависимые РНК-полимеразы *E. coli* или фага Т7, не влияет на их ферментативную активность.

Далее мы попытались установить влияние белка Е и МкАт к нему на стадию инициации синтеза вирусоспецифичных РНК с помощью метода аффинного мечения реакционноспособными аналогами АТР в ранее описанных условиях [1]. Результаты, приведенные на рис. 2, свидетельствуют о том, что активизирующее действие антител к белку Е и ингибирующее влияние самого белка оболочки ВКЭ имеют место на стадии связывания репликативного комплекса с матрицей при формировании первой фосфодиэфирной связи, поскольку наблюдается усиление модификации

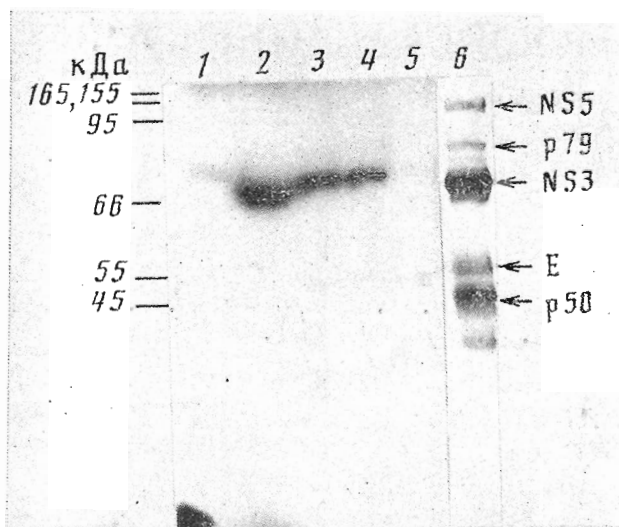


Рис. 2. Радиоавтограмма продуктов аффинного мечения белков, разделенных диск-электрофорезом в 10% ПААГ. Аффинное мечение белков в составе репликативного комплекса ВКЭ проводили как описано ранее [1] с помощью *o*-гидрокси метил-*n*-формилфенилового эфира АТР и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$. Предварительно репликативный комплекс инкубировали с МкАт 2НЗ в разбавлении 1 : 200 (дорожка 2), 1 : 2000 (дорожка 3), 1 : 20 000 (дорожка 4) или с белком Е в концентрации 1 мкг/мл (дорожка 5) либо без добавок (дорожка 1). Смеси инкубировали 15 мин при 25° С, затем добавляли аналог АТР, проводили восстановление NaBH_4 , добавляли радиоактивно меченный GTP и продукты анализировали диск-электрофорезом. Молекулярную массу продукта модификации определяли, используя маркерные белки фирмы Sigma (их молекулярные массы указаны слева). Вирусоспецифические белки (дорожка 6) выявляли иммуноблоттингом, используя поликлональные антитела к белкам ВКЭ [1]

белка NS3 (дорожки 2—4) и снижение аффинного мечения этого вирусоспецифического белка в присутствии белка Е (дорожка 5).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что репликация генома ВКЭ *in vitro* ингибируется оболочечным белком Е на стадии инициации синтеза РНК. Это влияние, возможно, обусловлено связыванием белка Е с матрицей или с белками репликативного комплекса.

Авторы выражают благодарность Е. К. Прессману (НИБХ) за любезно предоставленные препараты белка Е ВКЭ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Морозова О. В., Белявская И. А., Зайчиков Е. Ф., Кветкова Э. А., Мустаев А. А., Плетнев А. Г. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. № 4. С. 492—500.
2. Grun J. B., Brinton M. A. // J. Virol. 1987. V. 61. № 11. P. 3641—3644.
3. Чумаков М. П., Кусов Ю. Ю., Рубин С. Г., Семашко И. В., Сальников Я. А., Ренгольд В. А., Прессман Е. К., Цегановская Н. А. // Вопр. вирусол. 1984. Т. 29. № 6. С. 694—701.

Поступило в редакцию
4.XII.1989

O. V. MOROZOVA, N. A. BELYAVSKAYA *, I. E. MATVEEV,
E. A. KVETKOVA *, A. G. PLETNEV

TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS REPLICATIVE COMPLEX. II. SYNTHESIS OF RNA IN VITRO IS EFFECTED BY ANTIBODIES AGAINST ENVELOPE PROTEIN AND E PROTEIN ITSELF

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR; * Omsk Institute of Natural-Foci Infections, RSFSR Ministry of Health*

Role of the coat protein E of the tick-borne encephalitis virus in the viral RNA replication *in vitro* was investigated. It is shown that addition of the exogenous E protein to the TBEV replicative complex inhibits the viral RNA synthesis, whereas addition of polyclonal and monoclonal antibodies against E protein effectively stimulates it. Affinity labelling technique and immunoblot staining of proteins revealed that E protein and anti-E antibodies affect the initiation stage of the viral RNA synthesis.