



УДК 576.858.23

НЕОДНОРОДНОСТЬ POLY(C)-ТРАКТА РНК
ВИРУСА ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА

Свиткин Ю. В.

*Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР, Московская обл.*

Крупи Г., Гросс Г.

Институт биохимии Вюрцбургского университета, Вюрцбург, ФРГ

Определена нуклеотидная последовательность T1 рибонуклеазного фрагмента РНК вируса энцефаломиокардита, включающего в себя poly(C)-тракт: (5')AC₁₂₆₍₁₂₇₎UCUCUCUC₆UAACG(3'). Полученные результаты показывают, что poly(C)-тракт неоднороден и прерывается последовательностью UCUCUCU. Фрагмент РНК, содержащий poly(C)-тракт, характеризуется аномально высокой подвижностью в полиакриламидных гелях по сравнению со статистическими полинуклеотидами, что свидетельствует о занижении оценок его длины методами электрофореза.

После работы Портера и др. [1] стало известно, что геномная РНК вируса энцефаломиокардита (ЭМК) содержит тракт остатков цитидиловой кислоты, poly(C). Предполагалось, что этот тракт представляет собой гомополимер длиной ~90 нуклеотидов. Протяженные poly(C)-тракты были также обнаружены в РНК двух других кардиовирусов и нескольких серотипов вируса ящера [2]. Удивительно, что эта структура отсутствует в геноме других пикорнавирусов, таких, как энтеровирусы и риновирусы [2-4].

Poly(C)-последовательность расположена в 5'-концевом районе вирусной РНК [5-7] до того места, где происходит инициация синтеза белка [8, 9]. Расстояние от 5'-конца РНК до poly(C) составляет, по-видимому, ~140 нуклеотидов для РНК вируса ЭМК [8] и 400 нуклеотидов для РНК вируса ящера [10]. 5'-Концевая нуклеотидная последовательность РНК вируса ЭМК до poly(C)-тракта была недавно почти полностью определена [11]. Для того чтобы выяснить функцию poly(C)-тракта в репликации вирусного генома, необходимо, вероятно, детально исследовать эту структуру, и в частности определить, представляет ли она непрерывную последовательность остатков цитидиловой кислоты. В настоящей работе мы использовали быстрые методы анализа нуклеотидной последовательности РНК для выяснения первичной структуры крупного T1-рибонуклеазного фрагмента РНК вируса ЭМК, включающего в себя poly(C)-тракт (poly(C)-фрагмента). В отличие от предыдущей работы [12] мы выявили вставки уридилловых остатков вблизи от 3'-конца тракта.

Poly(C)-фрагмент РНК вируса ЭМК получали по ранее описанной методике [1] с незначительными модификациями (см. «Экспериментальную часть»). Для определения 3'-концевой нуклеотидной последовательности использовали фрагмент РНК, меченный по 3'-концу с помощью [5'-³²P]pCr и РНК-лигазы. Фрагмент РНК подвергали неполному щелочному гидролизу и образующиеся 3'-³²P-меченные олигонуклеотиды фракционировали в тонком слое с помощью высоковольтного электрофореза и гомохроматографии. Результат двумерного разделения (рис. 1a) свидетельствует о том, что на 3'-конце фрагмента находится нуклеотидная последовательность ...CCCCCUAACG(3'). Помимо основной группы олигонуклеотидов на автордиограмме выявляется также и менее интенсив-

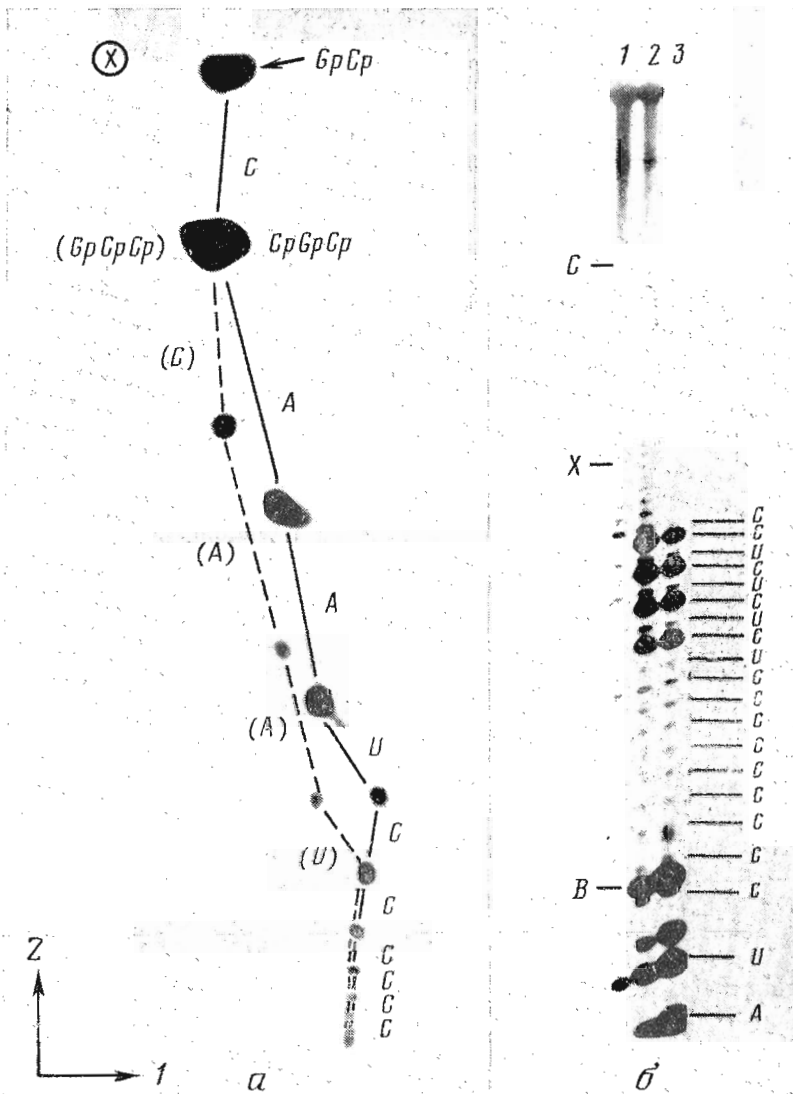


Рис. 1. 3'-Концевая последовательность нуклеотидов poly(C)-фрагмента РНК вируса ЭМК: а -- двумерное разделение меченых олигонуклеотидов. Poly(C)-фрагмент, меченный по 3'-концу, $[5\text{-}^{32}\text{P}]\text{pC}$, частично гидролизовали щелочью и образующиеся фрагменты разделяли в двух направлениях с помощью высоковольтного электрофореза (направление 1) и гомохроматографии (направление 2). Сплошной линией соединена основная группа олигонуклеотидов с pCp на 3'-конце, пунктирной -- менее интенсивные пятна олигонуклеотидов, предположительно содержащих pCpCp на 3'-конце (обозначения этих олигонуклеотидов приведены в скобках). X-положение маркерного красителя ксиленианола; б -- анализ в полиакриламидном геле. Poly(C)-фрагмент, меченный по 3'-концу, обрабатывали РНКазой T1 для удаления концевых цитидиловых остатков, переваривали нуклеазой из *S. aureus* при pH 7,5 в присутствии 10 mM Ca^{2+} [13] и анализировали в геле ($20 \times 40 \times 0,035$ см). Условия инкубации: 1 -- без фермента, 2, 3 -- с нуклеазой из *S. aureus* (соответственно с 0,1 и 0,5 ед. акт. на 1 мкг РНК). С, X и В -- позиции маркерных красителей Кумасси G-250, ксиленианола FF и бромфенолового синего соответственно. Дополнительные (не обозначенные на электрофореграммах) полосы не совпадают с полосами в маркерной «лестнице» и вызваны промежуточным образованием 2',3'-циклофосфатных групп олигонуклеотидов. Интенсивные полосы на электрофореграммах соответствуют U или A в предшествующей нуклеотидной позиции [13]

ный набор пятен, по всей видимости возникающий при деградации фрагмента, меченного двумя цитидиловыми остатками (эти пятна соединены пунктирной линией). Присоединение второго цитидилового остатка к части молекул фрагмента могло быть обусловлено частичным дефосфорили-

рованием 3'-концевого Ср в результате, например, фосфатазной контаминации использованного препарата РНК-лигазы. При последующем анализе последовательности нуклеотидов в полиакриламидном геле 3'-³²P-меченый фрагмент предварительно обрабатывали РНКазой T1 для удаления концевых цитидиловых остатков и получения уникального 3'-конца. На рис. 16 представлен анализ неполных продуктов гидролиза 3'-³²P-меченого poly(C)-фрагмента нуклеазой из *Staphylococcus aureus*. При pH 7,5 в присутствии ионов Ca²⁺ эта нуклеаза предпочитительно разрывает связи N-U и N-A, а не N-C и N-G [13]. Картины деградации четко выявляют неоднородность poly(C)-тракта. В самом деле, «лестницы» слабых полос, обусловленные расщеплениями по цитидинам, прерываются четырьмя интенсивными полосами. Эти полосы обусловлены расщеплениями по уридинам, поскольку А-специфическая РНКаза U₂ не вызывала их образования (не показано). Электрофореграммы на рис. 16 свидетельствуют о том, что остатки уридиловой кислоты локализованы в кластере UCUCUCU, расположенном на расстоянии девяти остатков цитидиловой кислоты от 3'-конца тракта.

Для определения 5'-концевой последовательности нуклеотидов использовали фрагмент РНК, меченый по 5'-концу с помощью [γ -³²P]АТР и полинуклеотидкиназы. Результаты двумерного разделения 5'-³²P-фосфорилированных олигонуклеотидов, образующихся при неполном щелочном гидролизе фрагмента РНК (рис. 2а), свидетельствуют, что на 5'-конце фрагмента находится последовательность нуклеотидов (5') АССССССССС... Анализы частичных продуктов гидролиза 5'-³²P-меченого poly(C)-фрагмента РНКазой U₂, нуклеазой из *S. aureus* и щелочью показали, что непрерывная полицитидиловая последовательность продолжается вплоть до нуклеотида № 127. Для адекватного разрешения эти анализы производили в длинном (88 см) геле. Была проведена короткая разгонка для отсчета нуклеотидов с № 1, а также длительная разгонка для хорошего разделения полос в верхней области геля. Чтобы соотнести результаты короткой и длительной разгонок, параллельно анализировали неполный щелочной гидролизат 5S рРНК из печени кролика, меченный по 5'-концу. Наличие остатков гуанина обуславливает неравномерность «щелочной лестницы» 5S рРНК [14], что удобно использовать для калибровки полиакриламидных гелей. Верхняя часть автордиограммы геля после длительной разгонки представлена на рис. 2б. Видно, что первая интенсивная полоса на электрофореграмме гидролизата нуклеазой из *S. aureus* находится в позиции № 127. Учитывая отсутствие расщепления РНКазой U₂, это означает присутствие уридина в позиции № 128 (см. работу [13]). Несколько неожиданным оказалось присутствие восьми интенсивных полос в позициях № 127–134 вместо предполагаемых четырех (см. трек 4). Это означает гетерогенность poly(C): часть фрагментов содержит непрерывную последовательность из 126 цитидинов, а другая — из 127. Таким образом poly(C)-фрагмент РНК вируса ЭМК имеет следующую первичную структуру: (5') АС₁₂₆₍₁₂₇₎UCUCUCUC₉UAACG(3').

Необходимо отметить, что неоднородность poly(C)-тракта не была выявлена в предыдущей работе [12], поскольку лишь 5'-концевая последовательность анализировалась этими авторами, а UCUCUCU-кластер локализован вблизи от 3'-конца тракта. Вставки уридиловых остатков были недавно обнаружены в poly(C)-трактах РНК из двух серотипов вируса ящура [15]. Функциональное значение этих неоднородностей структуры пока неизвестно.

Определенная нами последовательность нуклеотидов хорошо согласуется с результатами олигонуклеотидного анализа poly(C)-фрагмента РНК вируса ЭМК с помощью РНКазы А [1]. Однако фактический размер poly(C)-фрагмента (~150 нуклеотидов) значительно больше 100 нуклеотидов, о которых сообщил Портер и др. [1]. Хотя это расхождение может быть обусловлено штаммовыми различиями (см. работу [12]), другие возможности кажутся нам более вероятными. В работе [1] оценка длины poly(C)-тракта проводилась с помощью электрофореза и радиоизотопным методом. В первом случае занижение оценки длины

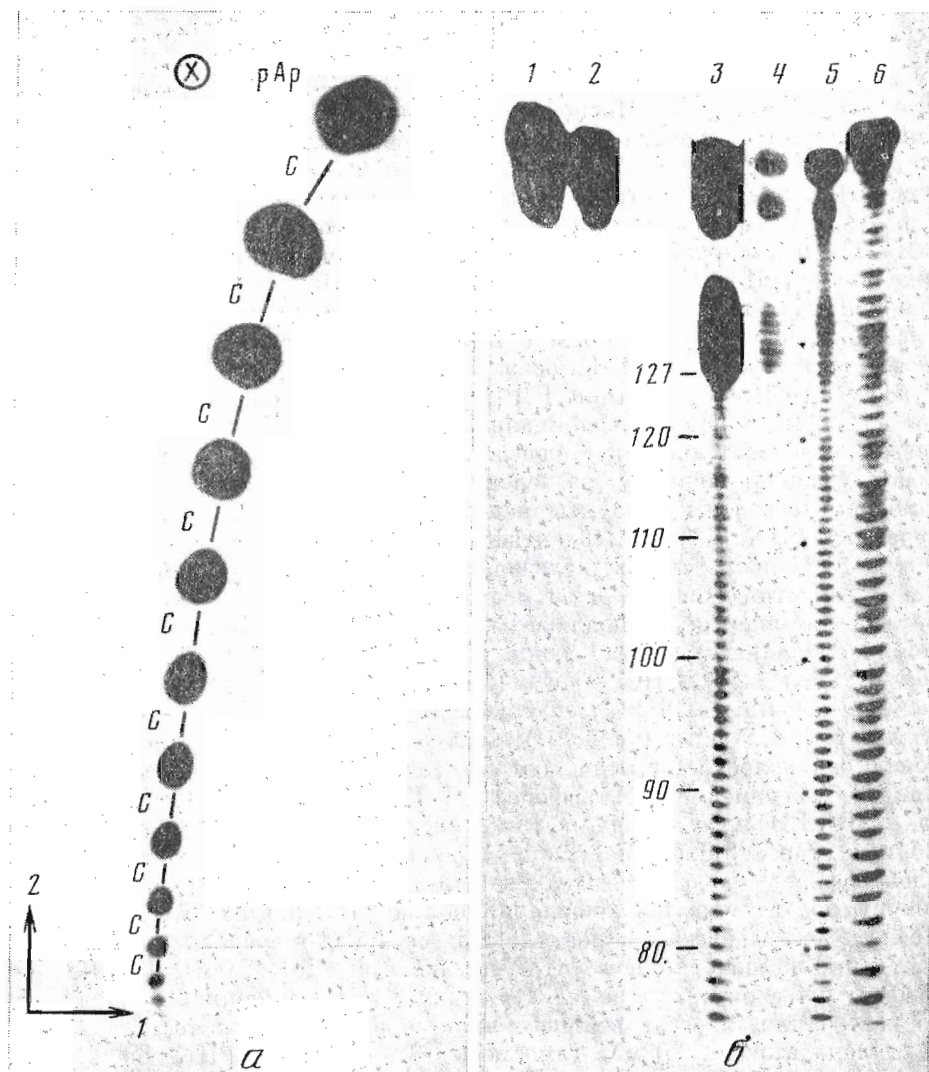


Рис. 2. 5'-Концевая последовательность нуклеотидов poly(C)-фрагмента РНК вируса ЭМК: а — двумерное разделение меченых олигонуклеотидов. Poly(C)-фрагмент, меченный по 5'-концу [γ - ^{32}P]АТФ, гидролизовали и разделяли в двух направлениях, как описано в подписи к рис. 1а. Идентификация концевого нуклеотида описана в «Экспер. части»; б — анализ в полиакриламидном геле. Poly(C)-фрагмент, меченный по 5'-концу, обрабатывали нуклеазами или щелочью и анализировали в геле ($25 \times 88 \times 0,035$ см). Электрофорез продолжали до тех пор, пока ксиленцианол не подходил к концу геля. Представлена верхняя часть автордиограммы. Условия обработки: 1 — без фермента; 2 — с РНКазой U_2 (0,01 ед. акт./мкг РНК); 3, 4 — с нуклеазой из *S. aureus* (0,05 ед. акт./мкг РНК) (представлены две различные фотографические экспозиции одной автордиограммы); 5 — щелочь (40 мМ NaOH, 6 М мочевины, 3 мин, 80°C); 6 — анализ частичного щелочного гидролизата 5S рРНК из печени кролика, меченной по 5'-концу

poly(C)-тракта могло быть связано с аномальной подвижностью poly(C) в полиакриламидных гелях. В самом деле, poly(C)-фрагмент движется в 10 и 20% полиакриламидных гелях почти так же, как 5S рРНК (120 нуклеотидов). Это согласуется с известным фактом о том, что С-скачки в электрофоретических лестницах меньше, чем А-, U- и особенно G-скачки [14, 16]. Радиоизотопный анализ, состоявший в определении длины ^{32}P -меченого poly(C)-фрагмента по соотношению радиоактивностей во фрагменте и 3'-концевом Gp, также мог быть ошибочным в связи с неравномерностью мечения вирусных РНК [^{32}P]ортофосфатом [17, 18].

Экспериментальная часть

Вирус ЭМК был исходно получен от д-ра Н. В. Каверина (Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского, Москва). Вирус выращивали в суспензии клеток Кребс-2, очищали [19] и обрабатывали фенолом [20] для экстракции вирусной РНК. Около 400 мкг РНК полностью переваривались РНКазой T1 [1]. После дефосфорилирования щелочной фосфатазой образующиеся фрагменты разделяли с помощью электрофореза в пластинках 10% полиакриламидного геля, содержащего 8 М мочевины, 90 мМ трис-борат (рН 8,3) и 2,5 мМ EDTA [21]. Полосу poly(C)-фрагмента, совпадающую по подвижности с маркером 5S рРНК, визуализировали под ультрафиолетовым светом с помощью флуоресцентного экрана, вырезали и элюированную РНК осаждали этанолом.

Poly(C)-фрагмент метили [32 P] по 5'- или 3'-концу, как описано ранее [14, 22], и повторно очищали с помощью гель-электрофореза. Концевые последовательности определяли, идентифицируя концевые группы и подвергая двумерному разделению (высоковольтный электрофорез — гомохроматография) продукты неполного щелочного гидролиза полярно-меченных РНК [23]. Для идентификации концевых групп 5'- или 3'-меченую РНК полностью гидролизовали нуклеазой (соответственно P1 или T2) и хроматографировали совместно с маркерными нуклеозидмонофосфатами на пластинках целлюлозы, используя две системы растворителей: изомасляная кислота — конц. аммиак — вода (577 : 38 : 385, рН 4,3), трет-бутанол — конц. HCl — вода (14 : 3 : 3). Для двумерного разделения полярно-меченные РНК гидролизовали щелочью на малую глубину (5 мМ NaOH, 5 мин при 80°С), нейтрализовали добавлением HCl и наносили на полоски ацетатцеллюлозы (3×55 см), предварительно пропитанные буфером для электрофореза (7 М мочевины, 5% уксусная кислота, 1 мМ EDTA и пиридин в количестве, обеспечивающем рН 3,5). Вблизи старта также наносили маркерный краситель — ксиленцианол. Электрофорез проводили в охлаждаемом высоковольтном аппарате при 5000 В до тех пор, пока ксиленцианол не отходил на 26 см от старта. После электрофореза радиоактивный материал переносили с помощью блоттинга на пластинки с DEAE-целлюлозой (20×40 см). Гомохроматографию проводили при 65°С ~ 10 ч; при этом ксиленцианол мигрировал до расстояния 5 см от верхнего края пластинки. В качестве растворителя использовали 20 мМ гомосмесь (3% раствор РНК из дрожжей в 7 М мочевины, гидролизованный 20 мМ КОН при 65°С в течение 20 ч и стабилизированный добавлением уксусной кислоты до рН 4,7).

Внутренние последовательности poly(C)-фрагмента определяли с помощью электрофореза в 20% полиакриламидном геле частичных гидролизатов РНК высокоспецифическими нуклеазами [13]. Использовали РНКазу U₂ (Sankyo Co. Ltd., Япония) и нуклеазу из *S. aureus* (Worthington, США).

Авторы благодарны проф. В. И. Аголу за полезные обсуждения статьи и Б. Фалькофф за техническую помощь в экспериментах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Porter A., Carey N., Fellner P. Nature, 1974, v. 248, № 5450, p. 675–678.
2. Brown F., Newman J., Stott J., Porter A., Frisby D., Newton C., Carey N., Fellner P. Nature, 1974, v. 251, № 5473, p. 342–344.
3. Kitamura N., Semler B. L., Rothberg P. G., Larsen G. R., Adler C. J., Dorner A. J., Emini E. A., Hanecak R., Lee J. J., Van der Werf S., Anderson C. W., Wimmer E. Nature, 1981, v. 291, № 5816, p. 547–553.
4. Racaniello V. R., Baltimore D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 8, p. 4887–4891.
5. Chumakov K. M., Agol V. I. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 71, p. 551–557.
6. Harris T. J. R., Brown F. J. Gen. Virol., 1976, v. 33, № 2, p. 493–501.
7. Perez-Bercoff R., Gander M., Preisig E. Virology, 1978, v. 85, № 2, p. 378–386.
8. Чумаков К. М., Чичкова Н. В., Агол В. И. Докл. АН СССР, 1979, т. 246, № 4, с. 994–996.

9. Sangar D. V., Black D. N., Rowlands D. J., Harris T. J. R., Brown F. J. *Viol.*, 1980, v. 33, № 1, p. 59-68.
10. Rowlands D. J., Harris T. J. R., Brown F. J. *Viol.*, 1978, v. 26, № 2, p. 335-343.
11. Вагранян А. Б. Структура ковалентного соединения белков VPg с вирусной РНК вируса энцефаломиокардита. Автореф. канд. дис. М.: МГУ, 1981.
12. Black D. N., Stephenson P., Rowlands D. J., Brown F. *Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 6, № 7, p. 2381-2390.
13. Krupp G., Gross H. *J. Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 6, № 11, p. 3481-3490.
14. Gross H. J., Krupp G., Domdey H., Raba M., Jank, P., Lossow C., Alberty H., Ramm K., Sanger H. L. *Eur. J. Biochem.*, 1982, v. 121, № 2, p. 249-257.
15. Harris T. J. R., Robson K. J. H., Brown F. J. *Gen. Virol.*, 1980, v. 50, № 2, p. 403-418.
16. Olins P. O., Jones D. S. *Nucl. Acids Res.*, 1980, v. 8, № 4, p. 715-729.
17. Golini F., Nomoto A., Wimmer E. *Virology*, 1978, v. 89, № 1, p. 112-118.
18. Lee Y F., Kitamura N., Nomoto A., Wimmer E. *J. Gen. Virol.*, 1979, v. 44, № 2, p. 311-322.
19. Kerr I. M., Martin E. M. *J. Virol.*, 1972, v. 9, № 3, p. 559-561.
20. Svitkin Yu. V., Agol V. I. *FEBS Lett.*, 1978, v. 87, № 1, p. 7-11.
21. Konarska M., Filipowicz W., Domdey H., Gross H. *J. Eur. J. Biochem.*, 1981, v. 114, № 2, p. 221-227.
22. England T. E., Bruce A. G., Uhlenbeck O. C. *Methods in Enzymology*, 1980, v. 65, p. 65-74.
23. Silberklang M., Gillum A. M., RajBhandary U. L. *Methods in Enzymology*, 1979, v. 59, p. 58-109.

Поступила в редакцию
3.V.1983
После доработки
3.VIII.1983

DISCONTINUITY OF THE POLY(C) TRACT OF ENCEPHALOMYOCARDITIS VIRUS RNA

SVITKIN Yu. V., KRUPP G., GROSS H. J.

*Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalities, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow Region; Institut fur Biochemie der Universitat Wurzburg,
Wurzburg*

The nucleotide sequence of the RNase T1-resistant fragment of encephalomyocarditis virus RNA that includes the poly(C) tract was determined by gel sequencing and mobility shift methods. This sequence is (5') AC₁₂₆₍₁₂₇₎ UCUCUCUC₉UAACG (3'). The results show that the poly(C) tract is discontinuous, i.e., it is interrupted by the UCUCUCU-sequence. The tract displays anomalously high mobility in polyacrylamide gels as compared to random polynucleotides, indicating that electrophoretic determination of its length gives underestimated values.