



УДК 547.963.32

**ФОСФОДИЭФИРНАЯ СВЯЗЬ РНК ВИРУСА
ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА С ОСТАТКОМ ТИРОЗИНА БЕЛКА VPg***Вартапетян А. Б., Дрыгин Ю. Ф., Чулаков К. М.**Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
биоорганической химии и молекулярной биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ;**Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Известно, что РНК пикорнавирусов ковалентно связаны с небольшими вирус-специфическими белками [1–7]. Ранее нами было показано, что пшжомолекулярный белок (VPg) ковалентно связан с 5'-концевой уридиновой кислотой РНК вируса энцефаломииокардита фосфодиэфирной связью, которая гидролизуетса фосфодиэстеразой зменного яда и довольно устойчива в кислой среде [7]. Задачей настоящей работы было выяснение природы аминокислотного остатка белка VPg, связанного с 5'-концевым нуклеотидом РНК.

Выращивание вируса энцефаломииокардита на клетках асцитной карциномы Кребс 2 и выделение препарата вирионной [³²P]РНК проводили как ранее [7]. Препарат [³²P]РНК – VPg предварительно обрабатывали фосфомоноэстеразой *E. coli* (КФ 3.1.3.1), чтобы удалить возможные фосфатные группы с белка VPg. Фосфомоноэстеразу инактивировали нагреванием (5 мин при 100° С в 1 мМ EDTA, рН 8). Препарат [³²P]РНК – VPg (400 мкг, 15 · 10⁶ имп/мл) гидролизовали смесью РНКаз: А (КФ 2.7.7.16), Т₁ (КФ 2.7.7.26) и Т₂ (КФ 3.1.4.23) при рН 3,5 [9]. Белок, связанный с концевым уридин-3',5'-дифосфатом (VPg–pUp), из гидролизата осаждали 80% ацетоном, растворяли в буфере, содержащем 1% додецилсульфат натрия, и подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле (рис. 1). Зону полиакриламидного геля, соответствующую VPg–pUp, вырезали и обрабатывали пропазой R (Calbiochem, США, 100 мкг/мл) 12 ч при 37° С. Продукты гидролиза (пептиды–pUp) элюировали, элюат концентрировали, наносили на бумагу Whatman 3 MM (Англия) и разделяли электрофорезом при рН 3,5 при 5 кВ на приборе Shandon Southern L24 (рис. 2а).

Как видно из рисунка, [³²P]pUp связан с пептидами, различающимися, по-видимому, длиной [7]. Эти нуклеотидопептиды далее объединяли и обрабатывали 6 ч 4 н. соляной кислотой при 105° С. В указанных условиях О-фосфорилированные оксиаминокислоты (серин, треонин и тирозин) устойчивы на 30–50% [10, 11]. Производные тех же оксиаминокислот, связанные по оксигруппе с остатком уридиловой кислоты, подвергаются значительному разрушению даже при использовании более мягких условий кислотного гидролиза [12, 13]. В нашем случае при гидролизе пептидов-[³²P]pUp в качестве продуктов могли образоваться [³²P]фосфооксиаминокислота и [³²P]Up, если гидролизуетса фосфодиэфирная связь между уридином и его 5'-фосфатной группой, или немеченая оксиаминокислота

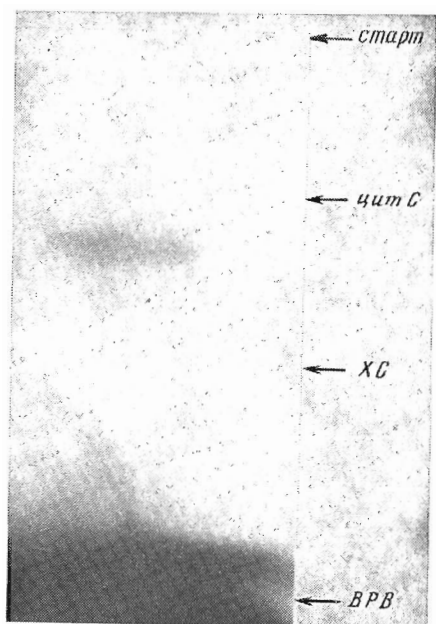


Рис. 1

Рис. 1. Электрофореграмма препарата $[^{32}\text{P}]\text{РНК}$ вируса энцефаломиокардита в 12,5% полиакриламидном геле с 0,1% додецилсульфатом натрия и 8 М мочевиной [8] после обработки его РНКазами А, Т₁ и Т₂. Стрелками отмечены положения свидетелей: цит С — цитохром С, ХС — ксиленианол, ВРВ — бромфеноловый голубой

Рис. 2. Электрофореграммы пептидов-рUр до (а) и после (б) обработки 4 н. НСl. Цифры I, II, III указывают положение пептидов-рUр, ХС — положение ксиленианола

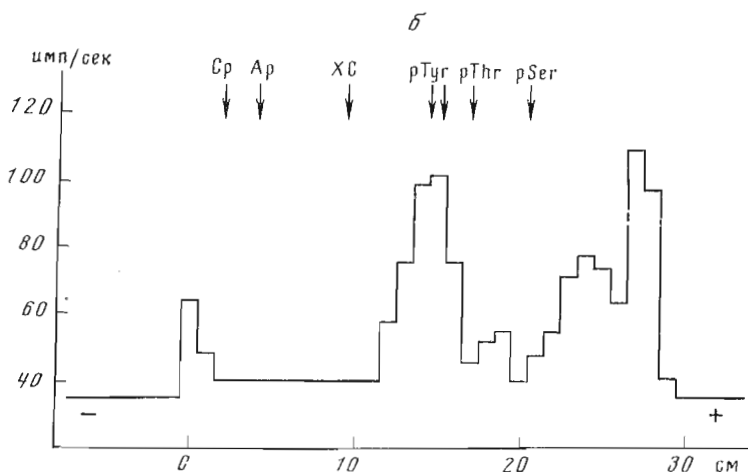
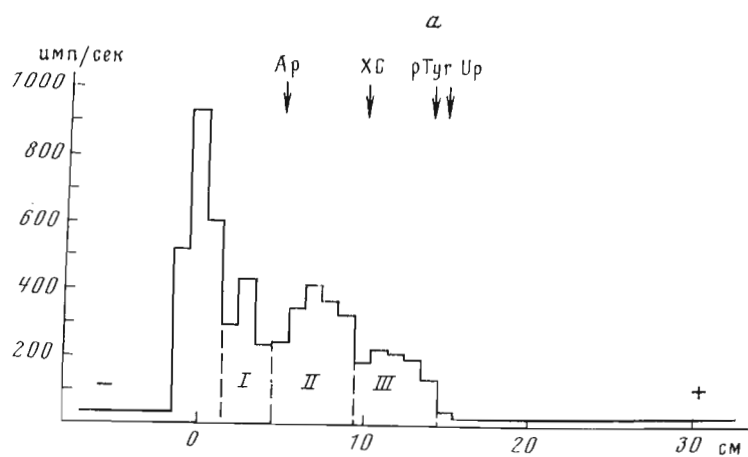


Рис. 2

и [^{32}P]pUp, если гидролизуетя фосфодиэфирная связь со стороны остатка оксиаминокислоты. В использованных условиях кислотного гидролиза pUp сохраняется на 40% и, следовательно, может быть идентифицирован среди продуктов гидролиза.

Результаты электрофореза продуктов кислотного гидролиза [^{32}P]пептидов-pUp представлены на рис. 2б. Нам не удалось обнаружить среди них ни О-фосфосерина, ни О-фосфотреонина. Более того, дополнительный анализ электрофорезом на DEAE-бумаге DE-81 показал, что нет и pUp. Основной продукт кислотного гидролиза нуклеотидопептидов (не считая P_i) двигался широкой зоной с подвижностью, близкой к Up и О-фосфотирозину. Электрофорезом при pH 3,5 эти соединения не разделялись (см. рис. 2б).

Для идентификации основного, содержащего метку продукта гидролиза нуклеотидопептидов, его подвергли двумерной хроматографии в тонком слое целлюлозы [11]. В качестве свидетелей использованы уридин-3'-фосфат и синтезированный нами О-фосфотирозин. Радиоактивная метка обнаружена примерно в равных количествах как в пятне Up, так и в пятне О-фосфотирозина.

Суммируя вышеизложенное, мы считаем, что в вирусе энцефаломыокардита образуется фосфодиэфирная связь между 5'-концевой уридилевой кислотой РНК и гидроксильной группой остатка тирозина белка VPg.

Следует заметить, что в родственном пикорнавирусе — полиовирусе — именно остаток тирозина полио-VPg образует связь также с 5'-концевой уридилевой кислотой РНК полиовируса [11, 14]. Можно предположить, что в этих случаях имеет место универсальный механизм образования и гидролиза связи РНК — белок.

Авторы выражают глубокую благодарность А. А. Богданову и В. И. Аголу за просмотр рукописи и полезные обсуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee Y. F., Nomoto A., Detjen B. M., Wimmer E. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 59–63.
2. Flanagan J. B., Pettersson R. F., Ambros V., Hewlett M. J., Baltimore D. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 961–965.
3. Sangar D. V., Rowlands D. J., Harris T. J. R., Brown F. (1977) Nature, 268, 648–650.
4. Hruby D. E., Roberts W. K. (1978) J. Virol., 25, 413–415.
5. Golini F., Nomoto A., Wimmer E. (1978) Virology, 89, 112–118.
6. Perez-Percoff R., Gander M. (1978) FEBS Lett., 96, 306–312.
7. Дрыгин Ю. Ф., Вартапетян А. Б., Чумаков К. М. (1979) Молекулярн. биология, 13, 777–787.
8. Swank R. T., Munkres K. D. (1971) Anal. Biochem., 39, 462–477.
9. Adams J. M., Cory S. (1975) Nature, 255, 28–33.
10. Cohen-Solal L., Lian J. B., Kossiva D., Glimcher M. J. (1979) Biochem. J., 177, 81–98.
11. Rothberg P. G., Harris T. J. R., Nomoto A., Wimmer E. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 4868–4872.
12. Юодка Б. А., Савельев Е. П., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1968) Биохимия, 33, 907–915.
13. Юодка Б. А., Сасауаскене С. И. (1974) Химия природн. соед., 2, 216–220.
14. Ambros V., Baltimore D. (1978) J. Biol. Chem., 253, 5263–5266.

Поступило в редакцию
6.VI.1979

A PHOSPHODIESTER BOND BETWEEN THE ENCEPHALOMYOCARDITIS VIRUS RNA AND A TYROSINE RESIDUE OF VPg PROTEIN

YARTAPETYAN A. B., DRYGIN Yu. F., CHUMAKOV K. M.

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow; Institute of Polyomyelitis and Viral Encephalitis, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

VPg-[^{32}P]-pUp has been freed from the phosphatase — pretreated EMC RNA by ribonuclease digestion and PAG electrophoresis. After pronase treatment, the peptides covalently bound to [^{32}P]-pUp have been isolated by paper electrophoresis at pH 3.5. Acid hydrolysis of peptides — [^{32}P]-pUp yields [^{32}P]-tyrosine-phosphate, which in turn can be identified by thin-layer chromatography.