

Л. И. РОМАНОВА, Л. Д. ДУНАЕВСКАЯ, В. И. АГОЛ
**О СВЯЗИ МЕЖДУ КОМПЛЕМЕНТАРНЫМИ ЦЕПЯМИ
В МОЛЕКУЛАХ РЕПЛИКАТИВНОЙ ФОРМЫ РНК
ВИРУСА ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 18 V 1971)

Нами было показано, что по крайней мере часть молекул репликативной формы (р. ф.) РНК вируса энцефаломиокардита обладает аномальными денатурационно-ренатурационными свойствами. Если препарат р.ф. РНК денатурировать (путем нагревания или обработки диметилсульфоксидом), а затем снять денатурирующее воздействие, то происходит быстрая ренатурация части молекул р.ф. РНК, проявляющаяся в резистентности этой РНК к гидролитическому действию панкреатической РНКазы (¹). Был сделан вывод, что при денатурирующих условиях не происходит полного разделения комплементарных цепей р.ф. РНК. Для объяснения этого обстоятельства было высказано три предположения: либо р.ф. РНК представляет собой двуспиральную ковалентно-непрерывную циклическую структуру, либо комплементарные цепи в ней соединены какой-то сшивкой, либо, наконец, имеется комбинация того и другого (¹). Затем в препаратах р.ф. РНК вируса энцефаломиокардита методом электронной микроскопии были обнаружены кольцевые молекулы (²). Тем не менее нам казалось рискованным полностью объяснять быструю ренатурацию денатурированной р.ф. РНК наличием двуспиральных ковалентно-непрерывных колец, т. е. по механизму, сходному с тем, который имеет место у кольцевых двуспиральных ДНК (³). Против такого объяснения можно было привести несколько косвенных доводов. Тепловая денатурация, по нашим данным (¹), вносит по крайней мере один разрыв в подавляющее большинство молекул вирусной РНК. Если такая обработка вносит разрывы в молекулы р.ф. РНК, то денатурация кольцевых молекул должна сопровождаться полным разъединением комплементарных цепей, затрудняющим последующую ренатурацию. Кроме того, наблюдается значительное количественное расхождение между содержанием кольцевых молекул и степенью ренатурации р.ф. РНК: кольцевые молекулы содержатся обычно в количествах, не превышающих 10%, а ренатурировать может более половины материала р.ф. РНК (⁴). Поэтому казалось целесообразным более детально изучить причины, обуславливающие ренатурацию денатурированной р.ф. РНК. Методы выделения р.ф. РНК и одноцепочечной РНК вируса энцефаломиокардита описаны ранее (¹, ⁴).

Прежде всего необходимо было выяснить, не объясняется ли ренатурация денатурированной р.ф. РНК воссоединением полностью разъединенных, не связанных друг с другом комплементарных цепей. Для ответа на вопрос был поставлен следующий опыт. Вирионную одноцепочечную C¹⁴-РНК нагревали в течение 2,5 мин. при 100° в разведенном в 100 раз соевом цитратном растворе (0,15 M NaCl, 0,015 M цитрат натрия) вместе с 10-кратным избытком (по весу) H³-р.ф. РНК, быстро охлаждали и подвергали центрифугированию (ротар SW-25 ультрацентрифуги Spinco, 21 000 об/мин, 39 час.) в сахарозном градиенте (15—30%) при низкой ионной силе ($2,5 \times 10^{-4}$ M ЭДТА), т. е. при условии, препятствующем об-

разованию вторичной структуры. В полученных фракциях повышали ионную силу и исследовали кислотонерастворимую радиоактивность, общую и резистентную к РНКазе. Как видно из рис. 1, в денатурированном препарате р.ф. РНК имеется фракция, которая при низкой ионной силе седиментирует быстрее вирусной РНК. Комплементарные цепи, входящие в состав этой фракции, легко переходят в форму, устойчивую к

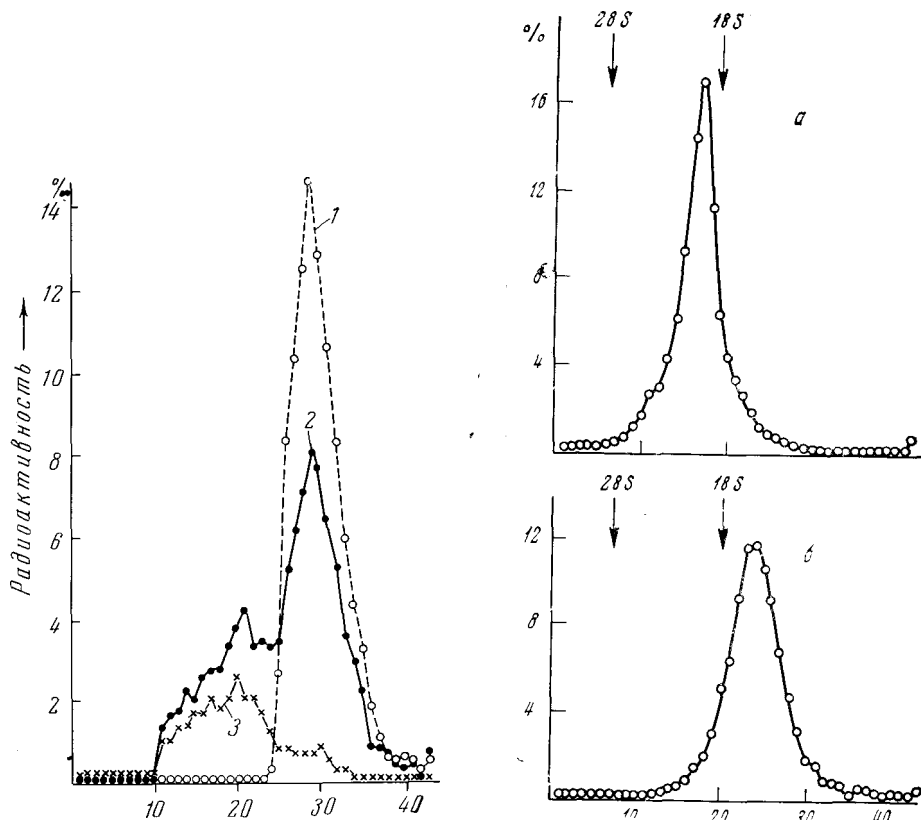


Рис. 1. Фракционирование денатурированной и ренатурированной р.ф. РНК. Смесь вирусной C^{14} -РНК и H^3 -р.ф. РНК обрабатывали и центрифугировали как указано в тексте; радиоактивность кислотонерастворимого материала до (1 — C^{14} ; 2 — H^3) и после (3 — H^3) обработки РНКазой (5 μ г/мл в с.д.р., 30° , 30 мин.). Здесь и на рис. 2 на оси абсцисс нанесены номера фракций

Рис. 2. Седиментационное поведение нативной (а) и фрагментированной (б) р.ф. РНК. Стрелками обозначено положение в градиентах пиков рибосомальных РНК, определенное по оптической плотности при 260 м μ

РНКазе, т. е. образуют двуспиральную структуру. Эта фракция не содержит C^{14} , а следовательно, и добавленной вирусной РНК. Таким образом, при этих условиях быстро ренатируют только те молекулы р.ф. РНК, комплементарные цепи которых связаны друг с другом.

Если эта связь обусловлена сшивкой между комплементарными цепями, то способность к ренатурации должна, по крайней мере частично, сохраняться после внесения двуцепочечных разрывов в молекулы р.ф. РНК; с другой стороны, если ренатурация обусловлена ковалентно-непрерывными кольцевыми структурами, то она должна исчезнуть после фрагментации р.ф. РНК. В связи с этим была исследована способность к ренатурации молекул р.ф. РНК, подвергнутых деградации путем воздействия гидродинамическими сдвигами. Раствор р.ф. РНК многократно подвергали быстрому продавливанию сквозь узкое отверстие, а затем фракцио-

нировали в сахарозном градиенте, как описано ранее (1). Как показывает рис. 2, скорость седиментации фрагментированных молекул р.ф. РНК существенно уменьшилась: коэффициент седиментации снизился с 20 S до примерно 15 S. Электронная микроскопия (методика будет описана в другом месте) материала, содержащегося в основном пике фрагментированной РНК, выявила гетерогенное распределение молекул по длине (рис. 3), причем все они были существенно короче интактных молекул, которые, по нашим данным, имеют длину 2,3—2,4 μ . Средняя длина фрагментированных молекул составляла 0,82 μ , что составляет примерно треть от средней длины целых молекул.

Препараты нативной и фрагментированной р.ф. РНК нагревали при 100° в 0,01 $\times$ с.д.р. (солевой цитратный раствор) в течение указанного времени, быстро охлаждали, увеличивали концентрацию солей в 100 раз и исследовали радиоактивность кислотонерастворимого материала после обработки РНКазой (5 μ г/мл, 30°, 30 мин.). В качестве контроля использовали р.ф. РНК, не подвергавшуюся нагреванию. Препараты фрагментированной р.ф. РНК обладали практически такой же способностью к ренатурации после тепловой денатурации, как и препараты интактной р.ф. РНК (табл. 1). Эти данные позволяют однозначно заключить, что, во-первых, комплементарные цепи у значительной части молекул р.ф. РНК вируса энцефаломиокардита действительно соединены сшивкой, причем в среднем приходится более одной и, по-видимому, более двух сшивок на молекулу р.ф. РНК; во-вторых, наличие сшивок является основной причиной наблюдаемой ренатурации денатурированной р.ф. РНК. Вместе с тем эти данные отнюдь не исключают существования ковалентно-непрерывных кольцевых молекул р.ф. РНК и возможного вклада этих молекул в денатурационно-ренатурационное поведение р.ф. РНК.

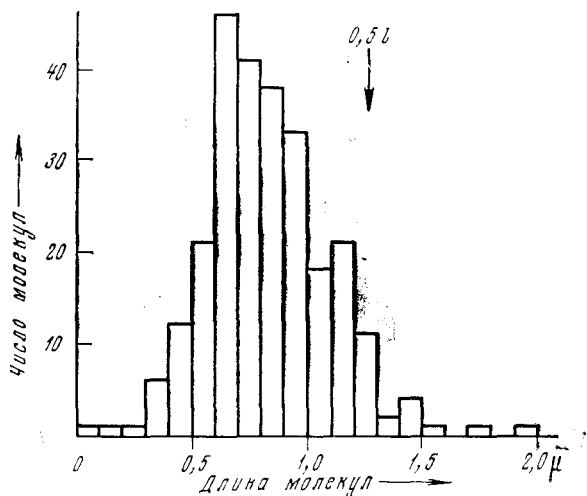


Рис. 3. Распределение фрагментированных молекул р.ф. РНК по длине. Стрелкой обозначена длина, соответствующая половине длины интактной молекулы р.ф. РНК

Таблица 1

Резистентность к РНКазе нативной и фрагментированной р.ф. РНК после денатурации и ренатурации

№№ п.п.	Препарат р.ф. РНК	Материал, резистентный к РНКазе, (% от контроля)	
		после прогрева в течение 2,5 мин.	после прогрева в течение 5 мин.
1	Нативный	47	28
	Фрагментированный	49	39
2	Нативный	—	21
	Фрагментированный	37	20

Обнаруженные особенности структуры изолированной р.ф. РНК вируса энцефаломиокардита могут соответствовать или не соответствовать ее свойствам *in vivo* в зараженной вирусом клетке. В частности, не исключена возможность, что прочная «сшивка» образуется в результате воздействий, применяемых при выделении препаратов р.ф. РНК. Можно предположить, что сшивка

обусловлена белком (например, РНК-полимеразой), фиксируемых на р.ф. РНК фенолом или додецилсульфатом натрия. Природа сшивки и ее отношение к процессу репликации изучаются в нашей лаборатории.

Авторы признательны Э. Н. Трифонову за советы, касающиеся способа фрагментации р.ф. РНК.

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР

Москва

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
17 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ В. И. Агол, Л. И. Романова и др., ДАН, 189, 423 (1969). ² V. I. Agol, Yu. F. Drygin et al., FEBS Letters, 8, 13 (1970). ³ J. Vinograd, J. Lebowitz, J. Gen. Physiol., 49, 103 (1966). ⁴ Л. И. Романова, В. И. Агол и др., Сборн. тр. Конфер. межфакультетск. лаб. биоорган. хим. Московск. унив., 1971, стр. 31.