

УДК 577.214.3

Взаимодействие РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса гепатита С с РНК-матрицами

К. А. Кондукторов, Г. С. Людва, А. В. Иванов, В. Л. Туницкая, С. Н. Кочетков[#]
 Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН,
[#] e-mail: kochet@eimb.ru

Гепатит С является одним из наиболее опасных и широко распространенных вирусных заболеваний. В настоящее время, по оценкам ВОЗ, вирусом гепатита С (ВГС) – этиологическим агентом инфекции, поражено около 170 млн человек практически во всех странах мира. Ключевым ферментом, осуществляющим репликацию генома ВГС, является РНК-зависимая РНК-полимераза (Р-РНКП, неструктурный вирусный белок NS5B). Р-РНКП имеет молекулярную массу ~67 кДа и локализуется на мембране эндоплазматического ретикулума пораженной клетки печени посредством С-концевого α -спирального трансмембранного домена (21 а.о.). Одним из характерных свойств Р-РНКП является ее способность катализировать синтез РНК как по праймер-зависимому, так и по праймер-независимому (*de novo*) механизмам [1]. В первом случае в опытах *in vitro* в качестве РНК-матрицы, как правило, используется праймер-матричный дуплекс поли(гА)-олиго(гУ), а во втором – фрагменты генома ВГС. Предполагается, что в репликации принимает участие олигомер из нескольких одинаковых молекул Р-РНКП, причем установлено, что в его образовании участвуют аминокислотные остатки H502 и E18, расположенные в области взаимодействия белковых глобул [2].

Ранее нами был получен штамм *E. coli* – продуцент Р-РНКП ВГС, позволяющий получить высокоочищенный рекомбинантный белок с выходом до 6 мг/л культуры, и разработана процедура очистки фермента до состояния, близкого к гомогенному (по данным электрофореза в полиакриламидном геле) [3]. Процедура очистки включала приемы, сходные с описанными в литературе [4]; определенные ки-

нетические параметры праймер-зависимой реакции для полученного препарата полимеразы также соответствовали литературным данным [5]. Однако при переходе к праймер-независимой репликации гетерогенных РНК (например, к матрице (-)IRES, представляющей собой 3'-нетранслируемый регион (-)цепи вирусного генома ВГС) было отмечено аномально высокое включение радиоактивной метки. Фермент также оказался неспособен к одношаговой элонгации олигонуклеотидов в праймер-зависимой системе, что ограничивало его возможности в исследованиях специфических ингибиторов. Эти факты указывали на возможные примеси клеточных РНК в препарате белка, образующих прочный комплекс с молекулой фермента и способных служить «эндогенной» матрицей. Вследствие этого представилось необходимым как модифицировать метод очистки фермента, так и более тщательно подойти к определению параметров его взаимодействия с матрицами разных типов.

Р-РНКП ВГС экспрессировали в клетках *Escherichia coli*, используя плазмиду рЕТ21-2с-5ВА55, как описано ранее [3]. Исходно выделение белка, содержащего на С-конце полипептидной цепи шесть остатков гистидина, проводили разрушением клеток ультразвуком и хроматографией лизата, осветленного центрифугированием, на колонке с Ni-NTA-агарозой в градиенте концентраций имидазола. Активность фермента определяли на основании измерения включения радиоактивно-меченного [γ ³²P]-УТР в высокомолекулярные продукты при использовании поли(гА)-олиго(гУ) праймер-матричного комплекса или (-)IRES матрицы. Полученный препарат Р-РНКП ВГС обладал высокой полимеразной активностью в праймер-зависимой системе ее определения.

При этом, при репликации РНК *de novo* наблюдалось высокое включение радиоактивной метки, как в присутствии, так и в отсутствие матрицы.

Модификация стандартного метода выделения заключалась в лизисе бактериальных клеток лизоцимом (1 мг/мл, Sigma, США) с последующим криолизом (2-3 цикла замораживания/оттаивания) в жидком азоте, после чего к лизату добавляли NH_4Cl до концентрации 1 М. После полного растворения хлорида аммония добавляли 10 % раствор полиэтиленimina (Serva, ФРГ) до конечной концентрации 1 %, раствор перемешивали 30-40 мин при 4 °С, центрифугировали при 3-5000 об/мин в течение 3 мин и отбирали супернатант. К супернатанту добавляли сульфат аммония до 80 % насыщения и инкубировали при 4 °С в течение ночи. Белки осаждали центрифугированием при 10 000 об/мин при 4 °С в течение 20 мин, осадок растворяли в минимальном объеме буфера, содержащем 20 mM Трис-НСl pH 7.5, 350 mM NaCl, 5 % глицерина, 1 mM β -меркаптоэтанола, 1 mM фенилметилсульфонилфторида (PMSF), 1 мкл/мл смеси ингибиторов протеаз (Sigma, США). Проводили диализ в два этапа (по 1 ч каждый) против 500 мл того же буфера. Диализат дважды наносили на колонку с Ni-NTA агарозой, уравновешенной тем же буфером. Отмывку колонки проводили 50 mM имидазолом. Белок элюировали 200 mM имидазолом и собирали по фракциям. Элюат диализовали в два этапа против 200 и 100 мл буфера (первый буфер содержал Трис-НСl 20 mM pH 7.5, NaCl 350 mM, 10 % глицерина, 0.5 mM ЭДТА, 10 mM β -меркаптоэтанола; состав второго буфера тот же, кроме 50 % глицерина) соответственно. Концентрацию белка измеряли по методу Бредфорд [6].

Общую и удельную активности фермента определяли по методу, описанному нами ранее [3].

Фосфорилирование РНК и препаратов Р-РНКП проводили при помощи Т4-полинуклеотидкиназы (Fermentas, Литва) и $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ согласно инструкции производителя. Фосфорилированную РНК очищали на микроколонках Micro-spin G-50 (GE Healthcare, США).

Кинетические параметры взаимодействия фермента с РНК определяли при помощи дот-блот гибридизации. Использовали 48-луночный доттер с применением нитроцеллюлозной и нейлоновой мембран (Bio-Rad, США). Нитроцеллюлозную мембрану помещали поверх нейлоновой

в доттере. Мембраны предварительно смачивали в буфере, содержащем 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 10 mM β -меркаптоэтанола. Фермент разводили с шагом в два раза от верхнего значения концентрации при 500 mM NaCl. Связывание РНК проводили при 4 °С в течение 30 мин в буфере для смачивания мембран, после чего наносили на мембраны. Концентрацию РНК определили опытным путем и довели до 2 nM. Высушенные мембраны экспонировались течение 40-60 мин и визуализировались при помощи Storage Phosphor Screen и Phosphor Imager (Packard, США). Математическую обработку результатов проводили с применением программ Total Lab и Origin 7.0.

Необходимость внесения изменений в методику очистки Р-РНКП была связана с возможным наличием в очищенном препарате рекомбинантного фермента коротких примесных РНК, возможно, относящихся к бактериальным рибосомальным или транспортным РНК. Эти примесные РНК могли бы конкурентно блокировать центры связывания нуклеиновых кислот в молекуле фермента и, таким образом, препятствовать взаимодействию *in vitro* с РНК-матрицами, добавляемыми в реакцию. Как известно, при обработке бактериальных клеток ультразвуком происходит механическое разрушение клеточных нуклеиновых кислот, которые дробятся на мелкие фрагменты различной длины. В данном случае часть из них, по-видимому, связывалась с рекомбинантной Р-РНКП, причем этот процесс протекал с высокой аффинностью, что препятствовало их отделению на дальнейших этапах очистки. Действительно, в результате обработки препаратов фермента $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ в присутствии полинуклеотидкиназы, осуществляющей, как известно, специфичное фосфорилирование свободного 5'-конца полинуклеотида, было выявлено наличие как минимум трех дискретных низкомолекулярных РНК, длины которых лежали в диапазоне от 12 до 60 нуклеотидов (рис. 1а и б). Кроме того, было показано образование комплекса белок-РНК в экспериментах по ковалентному сшиванию компонентов комплекса формальдегидом (рис. 1в). Попытки избавиться от данных примесей с использованием различных приемов, в частности, обработки высокими концентрациями NaCl (до 1.5 М) и дополнительной хроматографии на гепарин-агарозе, успеха не имели (данные не представлены).

В результате предложенный ранее метод выделения Р-РНКП был модифицирован таким образом, чтобы препа-

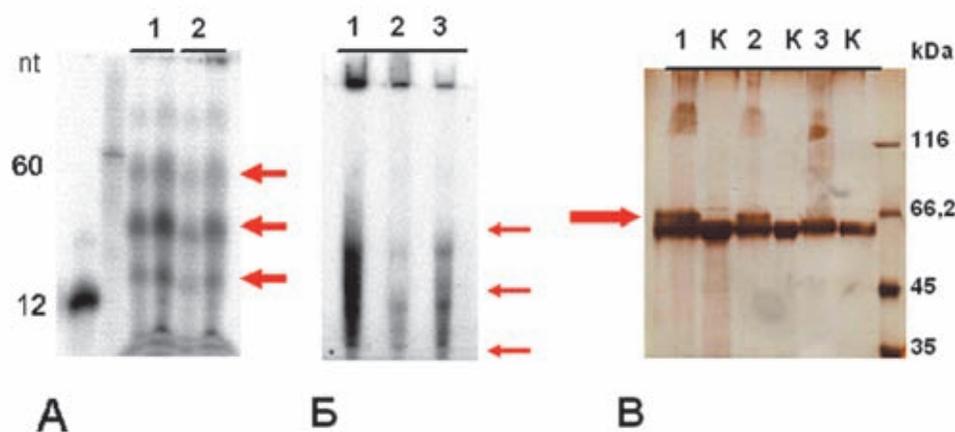


Рис. 1. Низкомолекулярные РНК в препаратах Р-РНКП, выделенных стандартным методом, выявленные фосфорилированием препаратов $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (дорожка 1 – дикий тип, 2 – двойной мутант) (а); значительно меньшее количество примесных РНК в препарате Р-РНКП дикого типа, выделенного модифицированным методом, выявлено фосфорилированием препаратов $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (дорожка 1 – дикий тип старого выделения, 2 – дикий тип модифицированного выделения, 3 – двойной мутант старого выделения, К – отрицательный контроль без сшивки) (б); образование комплекса Р-РНКП старого выделения с примесной РНК, сшивки 1 % формальдегидом (дорожка 1 – дикий тип, 2 – мутант с одиночной заменой, 3 – двойной мутант) (в); а, б – радиоавтография, в – окраска серебром

рат активного фермента не содержал примесных РНК. Модификация заключалась в замене способа разрушения бактериальных клеток, тогда как последующие этапы очистки остались прежними. При использовании данного метода исключалась обработка клеток ультразвуком, приводящая к образованию коротких НК, а высокая концентрация соли приводила к диссоциации белково-нуклеиновых комплексов и препятствовала сосаждению целевого белка с нуклеиновыми кислотами. Такой подход ранее был с успехом применен нами при очистке рекомбинантной T7 РНК-полимеразы [7].

Поскольку вопрос об олигомеризации фермента при связывании РНК по-прежнему остается открытым, в эксперименте наряду с ферментом дикого типа мы использовали полученный нами двойной мутант (DM) Р-РНКП (H502L, E18A), который по литературным данным не способен к олигомеризации [2], а также две мутантные формы Р-РНКП с единичными точечными заменами близ активного центра (R222A и C223A), которые, предположительно, могли влиять на связывание фермента с РНК. Препараты Р-РНКП дикого типа, выделенные новым методом, отличались высокими значениями удельной активности (9.2 нмоль/мин · 1 мкг фермента). Согласно литературным данным [2], двойная аминокислотная замена (H502L, E18A) в Р-РНКП ВГС приводит к неактивности двойного мутанта. Однако наши данные показали, что удельная активность двойного мутанта несколько выше, чем у фермента дикого типа (20.4 нмоль/мин · 1 мкг фермента).

Следует отметить, однако, что использование нового метода приводило к уменьшению выхода целевого белка. Если при выделении стандартным методом выход Р-РНКП составлял 3-5 мг/л клеточной культуры, то при выделении новым методом выход не превышал 1 мг/л. Кроме того, как выяснилось, препараты Р-РНКП, не содержащие примесных полинуклеотидов, имеют гораздо меньшую стабильность. В отличие от стандартных препаратов, стабильных при температуре хранения -20 °С в течение одного года, новые препараты сохраняли свою активность максимум один месяц при температуре -85 °С (данные не представлены). Это явление объясняется возможным участием примесных полинуклеотидов в стабилизации фермента от инактивации.

Свободные от примесных полинуклеотидов препараты Р-РНКП обладали существенно более высоким средством

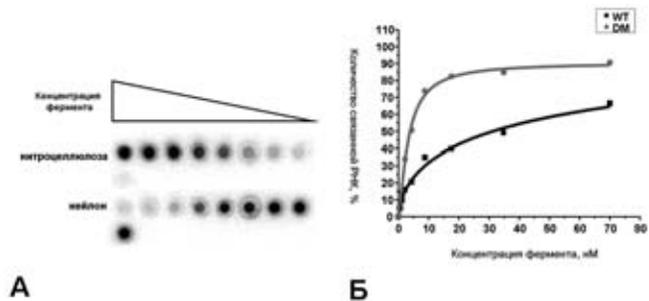


Рис. 2. Определение параметров связывания Р-РНКП с РНК. (А) дот-гибридизация на нитроцеллюлозной и нейлоновой мембранах; (Б) зависимость связывания РНК от концентрации фермента. Обозначения: WT – дикий тип, DM – двойной мутант

in vitro к РНК различной структуры. В экспериментах были использованы РНК трех типов – короткие (rA₂₀) и длинные (поли-rA) гомополимеры, а также протяженная гетерополимерная РНК ВГС (-IRES). Рис. 2 и табл. 1 демонстрируют полученные результаты.

Параметры взаимодействия Р-РНКП с РНК обчисливались в соответствии с уравнением Хилла [8], поскольку предполагается, что связывание протяженных РНК происходит кооперативно [9]. Как следует из табл. 1, константы диссоциации для Р-РНКП WT и DM в случае (rA₂₀) существенно различаются, т.е. олигомеризация Р-РНКП препятствует связыванию коротких РНК. В то же время при связывании протяженной гомополимерной матрицы оба фермента (WT и DM) ведут себя одинаково, и взаимодействие не кооперативно. На основании этих данных можно предположить, что, во-первых, сайт связывания матрицы не превышает 20 нуклеотидов и, во-вторых, при связывании протяженного полинуклеотида белком дикого типа структура олигомера меняется. В случае мутантов с одиночными заменами такой картины не наблюдалось, и оба белка показали сходные результаты.

Таким образом, нами был модифицирован метод получения Р-РНКП ВГС, позволивший получить рекомбинантный белок, свободный от примесных клеточных полинуклеотидов. Полученный препарат Р-РНКП обладал большим средством к различным РНК, что позволило уточнить параметры этого взаимодействия. ●

Табл. 1. Параметры связывания РНК ферментом, выделенным двумя способами. Обозначения: WT – дикий тип, DM – двойной мутант, n – коэффициент Хилла, K_d – константа диссоциации комплекса

Тип РНК	Параметры	Стандартный метод		Модифицированный метод	
		WT	DM	WT	DM
rA ₂₀	K _d (нМ)	57,86 ± 1,82	-	17,34 ± 6,62	2,73 ± 0,31
	n	0,59 ± 0,14	-	1,08 ± 0,21	1,38 ± 0,19
поли-rA	K _d (нМ)	-	-	0,81 ± 0,12	1,03 ± 0,13
	n	-	-	0,97 ± 0,21	0,83 ± 0,12
(-)IRES	K _d (нМ)	> 3000	> 3000	7,80 ± 1,21	14,69 ± 2,94
	n	-	-	1,24 ± 0,16	1,20 ± 0,18

Список литературы

- Bressanelli S., Tomei L., Roussel A., Incitti I., Vitale R.L., Mathieu M., De Francesco R., Rey F.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 13034-13039
- Qin W., Luo H., Nomura T., Hayashi N., Yamashita T., Murakami S. // J Biol Chem. 2002. V. 277. № 3. P. 2132-2137.
- Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., Kochetkov S.N. // Prot. Expr Purif. 2006. V. 48. № 1. P. 14-23.
- Hengen P. // Trends Biochem Sci. 1995. Jul;20(7):285-6.
- Zhong, W., Ferrari, E., Lesburg, C.A., Maag, D., Ghosh, S.K., Cameron, C.E., Lau, J.Y., Hong Z. // J.Virol., 2000. V. 74. P. 9134-9143.
- Bradford M.M. // 1976 May 7;72:248-54.
- Tunitskaya V.L., Akbarov A.Kh., Luchin S.V., Memelova L.V., Rechinsky V.O., Kochetkov S.N. // Eur J Biochem. 1990. V. 191. № 1. P. 99-103.
- Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика М., «Гранд», 1998. 720 с.
- Wang Q.M., Hockman M.A., Staschke K., Johnson R.B., Case K.A., Lu J., Parsons S., Zhang F., Rathnachalam R., Kirkegaard K., Colacino J.M. // J Virol. 2002 Apr;76(8):3865-72.