

УДК 577.213.36

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ РНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ МЕНГОВИРУСА И ЕЕ МУТАНТОВ

© 2013 г. Г.С. Шатская^{1*}, В.Л. Друца¹, О.Н. Королева²,
И.А. Остерман², Т.М. Дмитриева¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
119992 Москва; факс: (495) 939-3181,
электронная почта: barsa19@rambler.ru, drutsa@genebee.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119992 Москва; факс: (495) 939-3181,
электронная почта: koroleva@genebee.msu.ru, osterman@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.09.12
После доработки 02.10.12

Была изучена активность РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса менго (RdRP) дикого типа и ее мутантных вариантов, в которых С-концевой остаток триптофана был заменен на остатки аланина (W460A), фенилаланина (W460F) или тирозина (W460Y). Эти белки были экспрессированы в *E. coli* и очищены с использованием технологии IMPACT. Выделенные рекомбинантные белки исследованы в системе *in vitro* при элонгации праймера олиго(U) на матрице РНК, соответствующей 366-звенному 3'-концевому участку РНК вируса менго. Активность мутантных полимераз была сопоставима с активностью фермента дикого типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: РНК-зависимая РНК-полимераза, вирус менго, IMPACT-система.

Геном вируса менго, являющегося представителем семейства пикорнавирусов, представляет собой молекулу РНК («+»-цепь) длиной около 7600 нуклеотидов, имеющую на 3'-конце поли(А)-участок [1]. 5'-конец РНК ковалентно связан с небольшим вирусным белком VPg [2]. Несколько сотен нуклеотидов на 5'-конце и несколько десятков нуклеотидов на 3'-конце вирусной РНК, так называемые нетранслируемые области генома (5'-НТО и 3'-НТО), играют важную роль в регуляции трансляции и репликации вирусной РНК. РНК имеет одну открытую рамку считывания, кодирующую единый полипротеин, посттрансляционно расщепляемый вирус-специфическими протеазами [3, 4]. Появление в клетке вирусных белков дает возможность начать репликацию вирусной РНК. Геномная «+»-цепь РНК служит матрицей для синтеза «-»-цепей РНК, в результате чего образуется репликативная форма РНК, на которой асимметрично синтезируются дочерние молекулы «+»-РНК [5, 6]. 3'-НТО РНК вируса содержит нуклеотидные последовательности, необходимые для «посадки» РНК полимеразы, а также клеточных и ви-

русных факторов, участвующих в инициации и элонгации синтеза РНК [7–11]. Механизмы инициации синтеза «+»- и «-»-цепей РНК до конца не изучены, однако известно, что элонгация как «+»-, так и «-»-цепей осуществляется вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRP), состоящей у вируса менго из 460 аминокислотных остатков [12]. *In vitro* очищенная RdRP катализирует достройку с 3'-конца олигонуклеотидного РНК- или ДНК-праймера на любой одноцепочечной РНК-матрице. *In vivo* роль праймера выполняет уридилированный белок VPg или его предшественник. Непосредственно участвуя в процессе инициации репликации, он ковалентно присоединяется к 5'-концам как «+»-, так и «-»-цепей РНК. Полный цикл вирусной репликации осуществляется в достаточно сложных репликативных комплексах, в состав которых входят индуцированные вирусом мембранные везикулы и связанные с ними рибонуклеопротеидные комплексы, содержащие РНК-матрицу, вновь синтезируемые молекулы РНК и, помимо вирусной РНК-полимеразы, набор вирусных и клеточных белков [13, 14]. Специфичность РНК-белковых и белок-белковых взаимодействий в значительной

* Адресат для корреспонденции.

степени определяет эффективность репликации вирусного генома, поэтому важную роль играет структурная организация каждого из компонентов репликативного комплекса.

Молекула полимеразы RdRP состоит из трех доменов: «пальцы», «ладонь» и «большой палец» [15–19]. Взаиморасположение доменов, определяя структурную организацию фермента, играет важную роль в функционировании полимеразы. На основании результатов моделирования структуры РНК-полимеразы вируса менго с использованием данных рентгеноструктурного анализа полимераз ряда пикорнавирусов, а также других РНК-содержащих вирусов, было высказано предположение о том, что С-концевой остаток триптофана W460 RdRP обеспечивает взаимодействие с несколькими аминокислотными остатками домена «ладонь» [20]. Эти взаимодействия, сопровождающиеся фиксацией определенных структур с участием этих остатков на каждой стадии полимеразной реакции, возможно, обеспечивают запуск различных этапов синтеза РНК (инициация – элонгация – терминация). Ранее нами было показано, что мутации в триплете, кодирующем С-концевой остаток триптофана W460 полимеразы RdRP вируса менго, приводящие к замене триптофана на неполярные аминокислотные остатки (аланин и фенилаланин) или к его удалению, приводят к потере инфекционности вирусной РНК, тогда как при замене на большие полярные остатки (тирозин и гистидин) инфекционность сохраняется [20].

В настоящей работе была получена рекомбинантная RdRP и ее мутантные варианты, у которых С-концевой остаток триптофана заменен на остатки аланина (W460A), фенилаланина (W460F) или тирозина (W460Y), и изучено влияние этих замен на активность полимеразы *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. В работе использованы Tris, ЭДТА («Merck», Германия), NEPER («Sigma», США), IPTG («MP Biomedicals Inc.», Германия), дитиотриэтол, фенил-метил-сульфанилфторид (PMSF), ампициллин («Serva», США), АТФ («Sigma», США), [α - 32 P]УТР (4000 Ки/моль) и [3 H]АТФ (15 Ки/ммоль) (ЦКП «Фосфор» ИБХ РАН, Россия) рибонуклеозидтрифосфаты АТФ, ГТФ, СТР и УТР («Boehringer», Германия), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты dATP, dGTP, dCTP и dTTP («СибЭнзим», Россия), триптон, агар и дрожжевой экстракт («Difco», США), БСА («СибЭнзим», Россия), хитинсодержащий носитель («NEB», США), RNasin («Promega», США).

Препараты ферментов: РНК-полимераза T7, ДНКазы, полинуклеотидкиназа и ДНК-лигаза фага T4 («Fermentas», Литва), ДНК-полимераза *Thermus aquaticus*, TaqSE полимеразы («СибЭнзим», Россия), эндонуклеазы рестрикции («Fermentas», Литва и «СибЭнзим», Россия). Все энзиматические реакции проводили по прописям фирм-производителей ферментов.

Генно-инженерные операции проводили по стандартным методикам [21].

Олигонуклеотиды производства «Синтол», Россия: p23-lal – pAACCTATTTGTT-TATTTTCTAA; p26-laNr – pCGCTAGCGAG-ATTATCAAAAAGGATC; 21-orSl – CTGTGCGA-CGGCCGCGTTGCTG; 17-orr – ACCCCGTAG-AAAAGATC; p16-vpl – pGGTGCACTTGAGC-GGC; p19-vpWr – pTTACCAGAACAGGCTCCTC; p23-vpAr – pTTACGCGAACAGGCTCCTCCATG; p22-vpYr – pTTAATAGAACAGGCTCCTCCAT; p22-vpFr – pTTAGAAGAACAGGCTCCTCCAT; 18-lhvb – GTTCTGTACAACAACCTG; 19-poTr – GGCAAAAACCCCTCAAGA; 16-sql – GCGG-AGCCTATGGAAA.

Полимеразные цепные реакции (ПЦР) проводили в программируемом термостате «Циклотемп-107» («Циклотемп», Обнинск, Россия). Оптимальные условия для ПЦР подбирали эмпирически для каждого эксперимента.

Исходные плазмиды. Плазмида pTYB21 («NEB», США). Плазмида pM16, производная плазмиды pBluescribe M13+ со встроенной полной копией геномной РНК вируса менго [22], была любезно предоставлена А. Палменберг (Институт молекулярной вирусологии, университет Висконсин-Мэдисон, США).

Плазмида pEL – производная плазмиды pGEM – 7Zf(+) со встроенным после промотора T7 по сайтам *Apa*I и *Bam*HI 366-звенным фрагментом кДНК, соответствующим 3'-концевой области генома менговируса [20].

Вспомогательные плазмиды. Для конструирования вспомогательной плазмиды pBH1 (ориджин репликации; оперон β -лактамазы; полилинкер *Nhe*I/*Sal*I) получали ПЦР-копии оперона β -лактамазы (матрица pUC18; фосфорилированные праймеры p23-lal и p26-laNr) и ориджина репликации (матрица pUC18; праймеры 21-orSl и 17-orr). После соединения полученных фрагментов ДНК-лигазой и трансформации клеток *E. coli* ER1821 целевой клон отбирали с помощью рестриктного анализа по критерию наличия в его плазмиде близко расположенных сайтов рестрикции *Nhe*I и *Sal*I. Далее в плазмиде pBH1 по сайтам *Nhe*I и *Sal*I клонировали выделенный *Nhe*I/*Sal*I-фрагмент плазмиды pTYB21 с получением второй вспомогательной плазмиды pBH2.

На следующем этапе с использованием плазмиды pM16 в качестве матрицы получали четыре фосфорилированные ПЦР-копии гена РНК-полимеразы, содержащие на 5'-конце кодон GGT и на 3'-конце стоп-кодон TAA и различающиеся структурой последнего 3'-концевого кодона: *gRdRP(W460)* (фосфорилированные праймеры p16-vpl и p19-vpWr, природная структура); *gRdRP(A460)* (фосфорилированные праймеры p16-vpl и p23-vpAr); *gRdRP(Y460)* (фосфорилированные праймеры p16-vpl и p22-vpYr); *gRdRP(F460)* (фосфорилированные праймеры p16-vpl и p22-vpFr).

Далее с использованием плазмиды pBH2 в качестве матрицы и праймеров 21-orSl и 18-lhvb получали линейную плазмиду lpBH3, которую после электрофоретического выделения в агарозном геле соединяли T4 ДНК-лигазой с генами *gRdRP(W460)*, *gRdRP(A460)*, *gRdRP(Y460)* и *gRdRP(F460)*. Полученные конструкции клонировали в *E. coli* ER1821. Предварительный поиск клонов с плазмидами, содержащими ген в нужной ориентации, проводили методом ПЦР «на колониях» (праймеры p16-vpl и 19-poTr). Клетки отобранных клонов наращивали, выделяли из них плазмидные ДНК и секвенировали их в области встроенного гена (праймеры p16-vpl, 19-poTr и 16-sqtl). Полученные вспомогательные плазмиды содержали природный ген белка RdRP или его мутантные варианты, встроенные точно за последним кодоном гена интеина «технологического модуля».

Экспрессионные плазмиды. *NheI/SalI*-фрагменты из вспомогательных плазмид, содержащих природный и мутантные варианты гена RdRP, клонировали в векторе pTYB21 и получали конечные экспрессионные плазмиды pTYB21-*gRdRP(W460)*, pTYB21-*gRdRP(A460)* и pTYB21-*gRdRP(Y460)* и pTYB21-*gRdRP(F460)*, позволяющие по IMPACT-технологии нарабатывать препараты белков RdRP(W460), RdRP(A460), RdRP(Y460) и RdRP(F460), имеющие на N-концах полипептидных цепей аминокислотные остатки Gly, а на C-концах — аминокислотные остатки Trp, Ala, Tyr или Phe соответственно.

Выделение и очистка RdRP. Полученными экспрессионными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21 DE3. Колонии трансформированных клеток переносили в среду dyt (200 мл) с ампициллином (100 мкг/мл) и растили до плотности 0,5 (D_{550}) при 37°. Затем температуру снижали до 22°, добавляли IPTG до конечной концентрации 0,4 мМ. Через 6 ч клетки отделяли центрифугированием, замораживали и хранили при –80°.

После размораживания клетки ресуспендировали в 10 мл буфера А (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0,

500 мМ NaCl, 10% глицерин) в присутствии PMSF (1 мМ), разрушали ультразвуком, отделяли дебрис центрифугированием и супернатант пропускали через хитинсодержащую колонку (1 мл). Колонку промывали 4 раза буфером А, а затем — буфером Б (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 100 мМ NaCl, 10% глицерин). Отщепление целевых белков проводили в 1,5 мл буфера Б, содержащего 50 мМ DTT, в течение 18 ч при 4°. Процедуру отщепления повторяли два раза. Растворы белков концентрировали ультрафильтрацией и в виде аликвот хранили в буфере Б, содержащем 20% глицерина, при –80°. Из 200 мл клеточной культуры получали 0,5–1 мг белка. Полученные препараты ферментов анализировали методом электрофореза в 10%-ном Ds-Na-ПААГ. После окрашивания кумасси R-250 гель сканировали. Чистоту и концентрацию полученных белков оценивали при помощи программы Jel-ProAnalyzer 3.1 Software. Содержание основного продукта в полученных препаратах ферментов составляло около 90%. Белковые зоны вырезали, обрабатывали трипсином и продукты гидролиза анализировали с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометра Ultraflex II (Bruker).

Получение РНК-матриц. РНК менговируса была получена из клеток асцитной карциномы Кребс II, зараженных менговирусом, как описано в работе Дмитриевой и соавторов [23].

Для получения РНК-транскрипта ТМ-366 (соответствующего 366-звенному фрагменту менговирусной РНК и содержащий на 3'-конце участок поли(A)₂₃), плазмиду pEL (1,5 мкг) ли-неаризовали рестриктазой *Bam*HI и использовали в качестве матрицы в реакции транскрипции, катализируемой T7-РНК-полимеразой. Реакцию проводили в 50 мкл в течение 3 ч при 37°. Затем в реакционную смесь добавляли ДНКазу, свободную от РНКаз, и продолжали инкубацию еще 15 мин. После экстракции смесью фенол-хлороформ полученный РНК-транскрипт осаждали этанолом и растворяли в воде.

Препараты РНК менговируса и ТМ-366 анализировали электрофорезом в агарозном геле в ТАЕ-буфере и определяли концентрацию РНК по поглощению в УФ-области при длине волны 260 нм.

Определение активности РНК-полимераз *in vitro*. Активность препаратов рекомбинантных РНК-полимераз определяли на матрице ТМ-366. Реакционную смесь (25 мкл), содержащую препараты РНК-полимераз (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 пмоль), РНК-матрицу (8,0 пмоль) и олигоU₁₂ (50 пмоль), инкубировали в буфере (50 мМ Hepes, pH 8,0, 4 мМ DTT, 50 мкМ ZnCl₂, 3 мМ ацетата магния) в присутствии ингибитора рибонуклеаз (RNasin,

20 ед.) и смеси трифосфатов UTP, GTP, CTP (концентрация 250 мкМ), 10 мкМ АТР и 5 мкКи $[^3\text{H}]\text{АТР}$. Продукты реакции осаждали 5% ТХУ в 0,05 М растворе пирофосфата натрия в присутствии 100 мкг белка-носителя, фильтровали через бумажные фильтры (Whatman 3ММ) и после промывки 5% ТХУ измеряли их радиоактивность.

Для электрофоретического анализа РНК-продуктов, синтезируемых RdRP, реакцию проводили с использованием 5 мкКи $\alpha\text{-}[^{32}\text{P}]\text{UTP}$, 25 пмоль олиго U_{12} , 10 мкМ UTP и 250 мкМ АТР, GTP, CTP на матрице ТМ-366 (8,0 пмоль) или полноразмерной РНК менговируса (0,4 пмоль). Реакционную смесь инкубировали в течение 60 мин при 30°, экстрагировали смесью фенол-хлороформ и после очистки на Bio-Spin колонке (удаление не включенных в РНК нуклеозидтрифосфатов) осаждали этанолом и осадок растворяли в 2,5 мкл воды. После гликоксилирования (2,5 мкл РНК, 5,5 мкл DMSO, 1,9 мкл 40% деионизированного глиоксаля и 1,1 мкл 0,1 М натрий-фосфатного буфера, рН 7,0) анализ проводили электрофорезом в 1% или 1,5% агарозном геле в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,0. Затем гель высушивали и радиоавтографировали с использованием фосфоримиджера Fla-300 (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что С-концевой аминокислотный остаток РНК полимеразы менговируса важен для инфекционности вируса [20]. В связи с этим в настоящей работе предполагалось получение и исследование свойств ряда мутантных вариантов фермента, содержащих замену С-концевого триптофанового остатка.

В настоящем исследовании при проведении клонирования, экспрессии и выделения полимеразы для нас важно было, чтобы полученная рекомбинантная полимераз не несла на N- и С-концах каких-либо дополнительных «довесков», часто используемых для удобства быстрого выделения белка. Это связано с тем, что в литературе имеются примеры зависимости полимеразной активности от пространственного расположения N- и С-концов молекулы фермента [16, 24]. Например, в предшественнике полиовирусной полимеразы, вирусной протеазе 3CD, ее N-конец не обращен внутрь молекулы, как в собственно полиовирусной полимеразе, что может являться причиной того, что предшественник не обладает полимеразной функцией.

Поэтому для получения РНК-полимеразы менговируса использовали технологию IMPACT

(«New England Biolabs», США) [25]. По этой технологии целевой белок экспрессируют в *E. coli* в составе протяженного полипептида, содержащего домен CBD для аффинного выделения (прочно связывается с хитином или специальным хроматографическим носителем на основе агарозы с хитиноподобным лигандом) и модифицированный дрожжевой белок интеин, способный под действием нуклеофильных агентов (тиолов) обеспечивать саморасщепление составного полипептида. Поскольку в данной работе предполагалось получить и исследовать мутантные формы RdRP с заменами С-концевого аминокислотного остатка, была выбрана IMPACT-система на основе плазмиды pTYB21, позволяющая экспрессировать составной полипептид с технологическим модулем CBD-Int на N-конце целевого белка. Конструирование производных плазмиды pTYB21 проводили так, чтобы отщепляемые от технологического модуля молекулы строго соответствовали по первичной структуре RdRP дикого типа или запланированным ее мутантным формам. Получить такие плазмиды удалось путем создания серии промежуточных плазмид, одна из которых pBH2 содержала небольшой участок плазмиды pTYB21 между сайтами рестрикции *NheI* и *SalI*, в который с помощью ПЦР-технологии точно встраивали гены полимераз (природной или мутантных). После перенесения модифицированного фрагмента *NheI/SalI* в pTYB21 удалось получить экспрессионные плазмиды для получения природной и мутантных РНК-полимераз.

На рис. 1, а представлены результаты выделения RdRP(W460) из клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pTYB21-*gRdRP(W460)*. Полимераза была экспрессирована в составе протяженного полипептида, содержащего домен CBD (дорожка 1). Наличие в этом полипептиде интеина, за которым следует полимераз, способствует высвобождению RdRP под действием нуклеофильного агента (DTT, дорожки 3, 4).

Препараты мутантных полимераз были получены тем же способом, что и белок RdRP(W460). На рис. 1, б приведены результаты электрофоретического анализа RdRP(W460) (6), RdRP(Y460) (7), RdRP(A460) (8) и RdRP(F460) (9) в 10% ПААГ.

Электрофоретическая подвижность всех полимераз одинакова и соответствует положению белка с молекулярной массой 52 кДа. Первичная структура белков была подтверждена масс-спектрометрически.

Для исследования влияния произведенных замен на активность RdRP были проведены серии экспериментов по транскрипции *in vitro* на матрице 3'-концевого фрагмента менговиральной РНК в присутствии олиго(U) затравки. На рис. 2

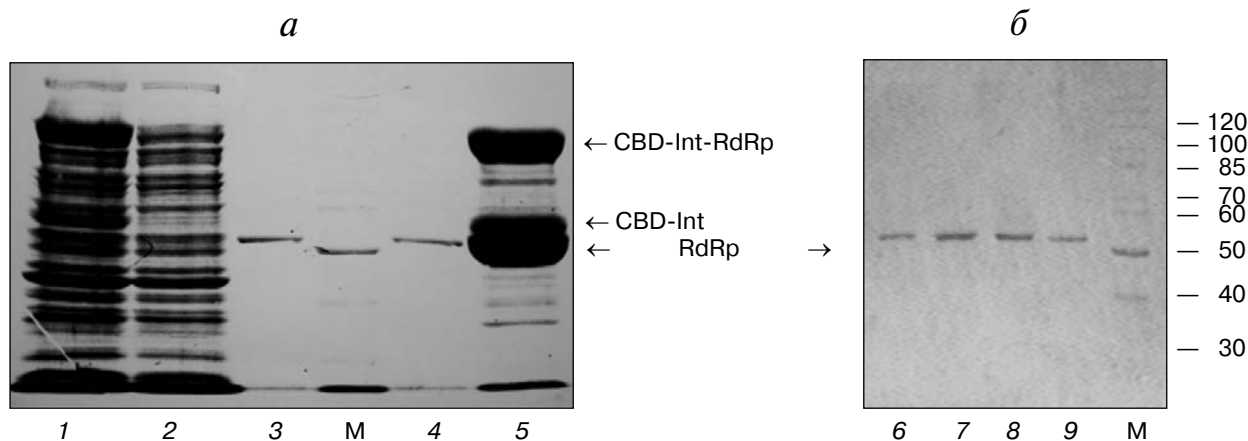


Рис. 1. *a* – Анализ белков в 10% ПААГ в процессе очистки рекомбинантной RdRP дикого типа (RdRP(W460)): лизат клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pTYB-21-RdRP(W460), до (1) и после (2) нанесения («проскок») на хитинсодержащую колонку; препараты белков после первой (3) и второй (4) элюций с колонки под действием DTT; белки, элюированные с колонки 1% раствором Ds-Na после двух предыдущих элюций (5). Стрелками указано положение составного белка (CBD-Int-RdRP), CBD-интеина (CBD-Int) и полимеразы (RdRp); *б* – анализ в 10% ПААГ препаратов RdRP(W460) (6), RdRP(Y460) (7), RdRP(A460) (8) и RdRP(F460) (9). Маркеры молекулярной массы (М), мажорная полоса соответствует 50 кДа

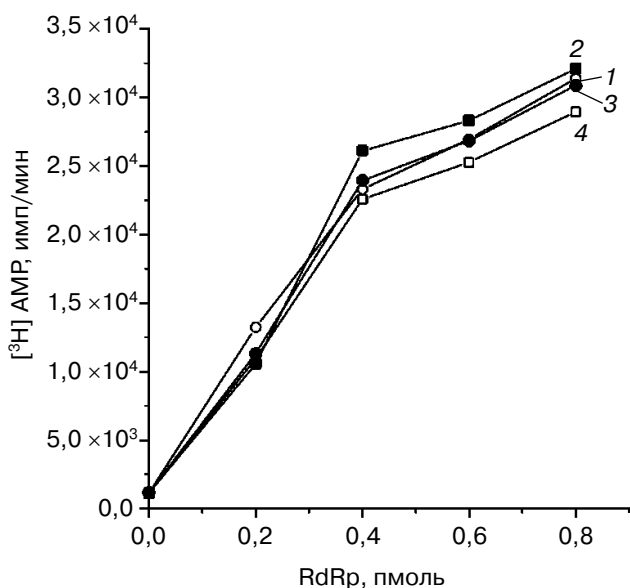


Рис. 2. Зависимость активности RdRP(W460) и ее мутантных вариантов от концентрации фермента. Активность препаратов РНК-полимеразы определяли по включению [³H]АМР в кислотонерастворимую фракцию. Различные количества полимеразы (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 пмоль) инкубировали с 8 пмоль ТМ-366 и 50 пмоль олиго(У)₁₂. Полимеразную активность RdRP(W460) (1) RdRP(A460) (2), RdRP(F460) (3) и RdRP(Y460) (4) измеряли после 1 ч инкубации при 30°

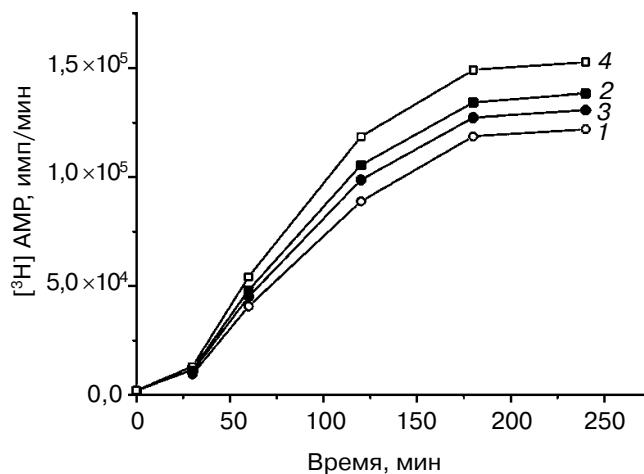


Рис. 3. Зависимость активности RdRP и ее мутантов от времени инкубации. 0,4 пмоль каждой из полимераз RdRP(W460) (1) RdRP(A460) (2), RdRP(F460) (3) и RdRP(Y460) (4) 8 пмоль ТМ-366, 50 пмоль олиго(У)₁₂ инкубировали в 25 мкл инкубационной смеси при 30°. После инкубации в течение 0, 30, 60, 120, 180 и 240 мин было измерено включение [³H]АМР в кислотонерастворимую фракцию

приведены результаты зависимости активности RdRP(W460) и ее мутантов от концентрации их в реакционной смеси. Характер кривых накопления продуктов транскрипции не выявляет заметных различий в активности полимераз. На рис. 3 приведена кинетика накопления продуктов катализируемой РНК-полимеразами транскрипции на матрице ТМ-366. Во всех случаях включение [^3H]АМР носит линейный характер на отрезке времени 0–120 мин, дальнейшая инкубация приводит к снижению скорости накопления продуктов. Поскольку продукт реакции представляет собой двуцепочечную РНК, этот эффект может быть связан с исчерпанием матрицы. В этих экспериментах также не наблюдается существенной разницы в активности исследуемых полимераз.

РНК-продукты, получаемые при участии RdRP и ее мутантов на матрице ТМ-366 или вирионной РНК менговируса в присутствии олиго(У) затравки, после денатурации были проанализированы в агарозных гелях. Результаты анализа представлены на рис. 4. Электрофоретическая подвижность РНК-продуктов, синтезируемых на этих матрицах при участии RdRP дикого типа и ее мутантов, соответствовали подвижности матричных РНК. Таким образом, совокупность приведенных данных позволяет утверждать, что замена в RdRP С-концевого триптофана на аланин, фенилаланин или тирозин не влияет на активность полимеразы *in vitro*.

Следует отметить, что репликация вирусных РНК в клетке, происходящая в вирус-индуцируемых мембранных везикулах, является сложным многоступенчатым процессом, протекающим с участием множества вирусных и клеточных компонентов. Ранее было показано, что замена в РНК менговируса 3'-концевого кодона триптофана в гене полимеразы, на кодоны аланина и фенилаланина, приводит к утрате инфекционности [20]. Тем не менее, в инфицированных этими РНК клетках наблюдался синтез вирусных РНК. В частности, в клеточном экстракте через 6 и 16 суток после трансфекции были обнаружены молекулы «—» РНК, комплементарные вирионной, в составе репликативной формы, причем количество «—» РНК даже через 16 суток было меньше, чем в контроле (РНК вируса дикого типа) через 3 суток. Следовательно, RdRP(A460) и RdRP(F460), как и RdRP(W460) и RdRP(Y460) способны осуществлять элонгацию

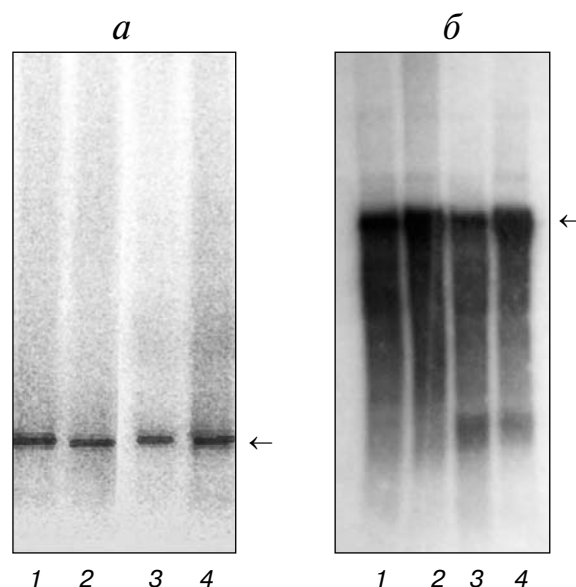


Рис. 4. Анализ [^{32}P]-меченых РНК, синтезируемых в присутствии препаратов RdRP(W460) (1), RdRP(A460) (2), RdRP(F460) (3) RdRP(Y460) (4) на матрице ТМ-366 (а) и вирионной РНК менговируса (б). Электрофоретическое разделение продуктов синтеза после глиоксилирования проводили в 1,5% (а) или 1% (б) агарозных гелях. Стрелкой показано положение матричной РНК

цепи РНК не только в системе *in vitro*, но и *in vivo*. Низкий уровень синтеза вирусной РНК *in vivo* при участии RdRP(A460) и RdRP(F460), возможно, объясняется уменьшением способности РНК-полимеразы эффективно взаимодействовать с другими белковыми компонентами репликативного комплекса в клетке.

Таким образом, замена С-концевого остатка RdRP, которая может приводить к изменению конформации белка, не влияет на функциональную активность РНК-полимеразы, но может влиять на эффективность взаимодействия полимеразы с другими компонентами репликативного комплекса в процессе его формирования.

Авторы выражают благодарность сотруднику НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова Серебряковой М.В. за проведение анализа белковых препаратов с помощью метода масс-спектрометрии MALDI-TOF.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рюкерт Р.Р. (1989) *Вирусология*, Мир, Москва, **2**, с. 91–256.
2. Ambros, V., and Baltimore, D. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 5263–5266.
3. Jakobson, M.F., and Baltimore, D. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **61**, 77–84.
4. Agol, V.I. (2002) *Molecular Biology of Picornaviruses, American Society for Microbiology*, 127–146.
5. Semler, B.L., and Wimmer, E. (2002) *Molecular Biology of Picornaviruses, American Society for Microbiology*, 109–126.
6. Roy, P., and Bishop D.H.L. (1970) *J. Virology*, **50**, 957–959.
7. Cui, T., Sankar, S., and Porter, A.G. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 26093–26098.
8. Pilipenko, E., Maslova, S., Synyakov, A., and Agol, V. (1992) *NAR*, **20**, 1739–1745.
9. Jakobson, S., Konings, D., and Sarnow, P. (1993) *J. Virol.*, **67**, 2961–2971.
10. Butcher, S.J., Grimes, J.M., Makeyev, E.V., Bamford, D.H., and Stuart, D.I. (2001) *Nature*, **410**, 253–240.
11. Steil, B.P., and Barton, D.J. (2009) *Virus Res.*, **139**, 240–252.
12. Koonin, E.V. (1991) *J. Gen. Virol.*, **72**, 2197–2206.
13. Bienz, K., Egger, D., Pfister, T., and Troxler, M. (1992) *J. Virology*, **66**, 2740–2747.
14. Egger, D., Pasamontes, Z., Bolten, R., Boyko, V., and Bienz, K. (1996) *J. Virology*, **70**, 8675–8683.
15. Hansen, J.L., Long A.M., and Schultz S.C. (1997) *Structure*, **5**, 1104–1122.
16. Thompson, A.A., and Peerson, O.B (2004) *EMBO*, **23**, 3462–3471.
17. Love, R.A.S. (2004) *Structure*, **12**, 1533–1544.
18. Appleby, T.C, Luecke, H., Shim, J.H.J., Wu, Z., Cheney, I.W., Zhong, W., Vogeley, L., Hong, Z., and Yao, N. (2005) *J. Virol.*, **79**, 277–288.
19. Cameron, C.E., Gohara, D.W., and Arnold, J.J. (2002) *Molecular Biology of Picornaviruses*, 255–267.
20. Dmitrieva, T.M., Alexeevski, A.V., Shatskaya, G.S., Tolskaya, E.A., Gmyl, A.P., Khitrina, E.V., and Agol, V.I. (2007) *Virology*, **365**, 79–91.
21. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. (1984) *Молекулярное клонирование*, Мир, Москва.
22. Duke, G.N., and Palmenberg, A.C. (1989) *J. Virology*, **63**, 1822–1826.
23. Dmitrieva, T.M., Norkina, K.B., and Agol, V.I. (1991) *J. Virology*, **65**, 2714–2717.
24. Marcotte, L.L., Wass, A.B., Gohara, D.W., Pathak, M.B., Arnold, J.J., Filman, D.J., Cameron, C.E., and Hogle, J.M. (2007) *J. Virology*, **81**, 3583–3596.
25. Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H., and Xu, M.Q. (1997) *Gene*, **192**, 271–281.

INVESTIGATION OF ACTIVITY OF RECOMBINANT MENGOVIRUS RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE AND ITS MUTANTS

G. S. Shatskaya^{1*}, V. L. Drutsa¹, O. N. Koroleva²,
I. A. Osterman², T. M. Dmitrieva¹

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky
Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119992;
fax: (495)939-3181, E-mail: barsa19@rambler.ru,
drutsa@genebee.msu.su

² M. V. Lomonosov Moscow State University, Department
of Chemistry, Moscow 119992; fax: (495)939-3181,
E-mail: koroleva@genebee.msu.su

Received September 18, 2012
Revision received October 2, 2012

The activity of wild type mengovirus RNA polymerase (RdRP) and its three mutants with C-terminal tryptophan residue replaced by alanine (W460A), phenylalanine (W460F), or tyrosine (W460Y) was studied. These proteins were expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography using IMPACT technology. The isolated recombinant proteins were studied in a cell-free replication system containing oligo(U) primer and RNA template corresponding to either viral genome RNA or 3'-terminal 366-mer fragment of the mengovirus RNA. The activity of the mutant enzymes was comparable to that of wild-type polymerase.

Key words: RNA-dependent RNA polymerase, mengovirus, IMPACT technology