



УДК 547.963.32.04

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНУЮ МЕТКУ

III. ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОПОЛИМЕРОВ ЦИТИДИЛОВОЙ
И 3, N⁴-ЭТЕНОЦИТИДИЛОВОЙ КИСЛОТ И ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ
С ТРИПТОФАНОВОГО НА ЭТЕНОЦИТОЗИНОВЫЕ ОСТАТКИ poly (C, εC)
В РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДЕ

Леднева Р. К., Разживин А. П.

*Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. И. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Описаны оптические свойства сополимеров цитидиловой и 3, N⁴-этеночитидиловой кислот. Показано, что увеличение содержания остатков 3, N⁴-этеночитозина в полинуклеотиде способствует образованию комплекса poly(C, εC) с белком вируса табачной мозаики. В комплексе имеет место тушение флуоресценции белка за счет переноса энергии возбуждения с триптофанового на этеноцитозиновые остатки, расстояние между которыми оценено в 19 ± 2 Å. Анализ флуоресцентных данных для двух модельных систем — комплексов белка вируса табачной мозаики с poly(A, εA) и poly(C, εC) — позволяет оценить расстояние между триптофановым остатком (вероятно, Trp⁵²) и областью связывания гетероциклических оснований РНК в вирусе табачной мозаики в 17–20 Å.

Одним из подходов к изучению структуры вируса табачной мозаики является изучение свойств вирусоподобных рибонуклеопротеидов (РНП), реконструированных из белка вируса и синтетических полинуклеотидов. Ранее было показано [1], что белок вируса табачной мозаики взаимодействует с сополимерами poly(A, εA) с образованием комплексов, содержащих флуоресцирующее этеноадениновое основание. Анализ флуоресцентных свойств комплексов привел к обнаружению безызлучательной миграции энергии возбуждения с триптофанового остатка на этеноадениновое основание и позволил оценить расстояние между ними в 15–19 Å.

Недостаток этеноаналога аденина как репортерной группы для изучения структуры вируса табачной мозаики заключается в том, что его введение в комплекс с вирусным белком затруднено, по-видимому, по стерическим причинам: белок взаимодействует лишь с полинуклеотидами с низким и средним содержанием остатков этеноаденина и не проявляет активности в отношении poly(εA).

Этеночитозин, значительно уступающий этеноаденину по флуоресцентным свойствам, является лучшим структурным аналогом аденина: замена аденинового основания этеноцитозиновым в ряде коферментов оказывает меньшее влияние на параметры их активности в биологических системах, чем замена этеноадениновым основанием [2]. Отсутствие флуоресценции

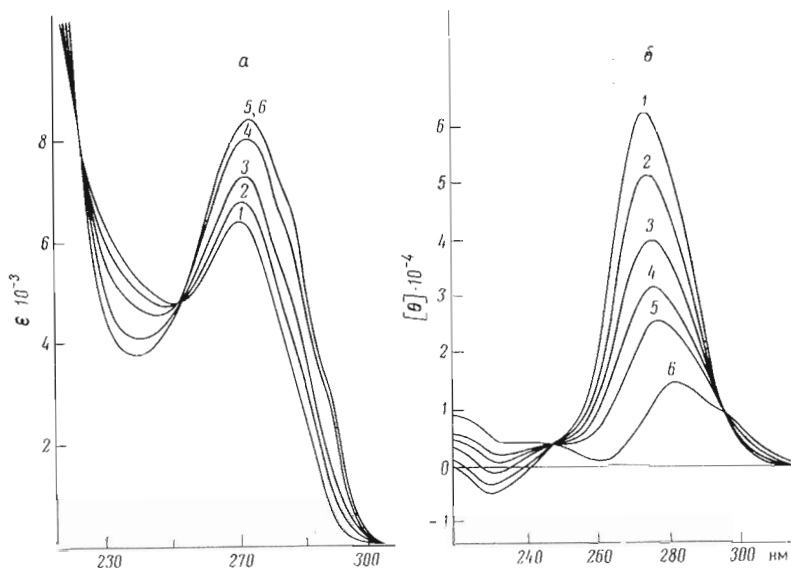


Рис. 1. Изменения спектров поглощения (а) и КД (б) в ходе модификации poly(C) хлорацетальдегидом: 1 — poly(C), 2 — poly(C₈₁, εC₁₉), 3 — poly(C₆₆, εC₃₄), 4 — poly(C₄₁, εC₅₉), 5 — poly(C₃₂, εC₆₈), 6 — poly(C₈, εC₉₂). Образцы для измерения спектров получали разведением реакционной смеси 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,2

этенцитозина в нейтральной среде [3] не позволяет использовать его в качестве флуоресцентной метки в наших исследованиях, однако в изучаемых РНП этенцитозин может выполнять функцию акцептора энергии при передаче ее по резонансному механизму.

С целью проверки правильности вывода о расстоянии между остатком триптофана белка и областью связывания гетероциклических оснований РНК в составе вируса в настоящей работе изучено взаимодействие белка вируса табачной мозаики с poly(εC) и сополимерами poly(C, εC). В работе описаны также оптические свойства сополимеров poly(C, εC), полученных модификацией poly(C) хлорацетальдегидом.

Модификация poly(C) хлорацетальдегидом, в ходе которой цитозиновые остатки заменяются этенцитозиновыми, сопровождается изменением оптических свойств полинуклеотида. Как видно из рис. 1, спектры поглощения и КД полинуклеотидов разной степени модификации имеют отчетливые изобестические (251,7 и 222 нм) и изодихроичные (296 и 248 нм) точки. Это позволяет представить спектр поглощения сополимера как суперпозицию спектров poly(C) и poly(εC). Тогда можно получить выражения для коэффициента молярной экстинкции и степени модификации (χ) любого сополимера poly(C, εC):

$$\epsilon_{\text{poly}(C, \epsilon C)}^{\text{макс}} = \epsilon^{\text{изобест.}} \cdot \frac{D_{\text{poly}(C, \epsilon C)}^{\text{макс}}}{D_{\text{изобест.}}} \quad (1)$$

$$\chi = \frac{\epsilon_{\text{poly}(C, \epsilon C)}^{\text{макс}} - \epsilon_{\text{poly}(C)}^{\text{макс}}}{\epsilon_{\text{poly}(\epsilon C)}^{\text{макс}} - \epsilon_{\text{poly}(C)}^{\text{макс}}} \quad (2)$$

Значения $\epsilon_{\text{poly}(\epsilon C)}^{\text{макс}}$ получали расчетным путем из спектров поглощения poly(C) и poly(C₈, εC₉₂) по описанной ранее схеме [4]. Для численного решения уравнений (1) и (2) были использованы коэффициенты молярной экстинкции $\epsilon_{\text{poly}(C)}^{270}$ ($6,4 \pm 0,1$) · 10³, $\epsilon_{\text{poly}(\epsilon C)}^{272}$ ($9,35 \pm 0,2$) · 10³, $\epsilon^{251,7}$ ($4,8 \pm$

**Оптические свойства сополимеров poly(C, εC) и их комплексов с белком
вируса табачной мозаики**

Полинуклеотид ^{1*}	Степень модификации (%) ^{2*}	УФ-поглощение ^{3*}		КД ^{3*}		Относительная интенсивность триптофановой флуоресценции	
		λ _{макс} , нм	ε · 10 ⁻³ , М ⁻¹ см ⁻¹	λ _{макс} , нм	[θ] · 10 ⁻⁵ , град · см ² /дмоль	в смеси белка с полинуклеотидом ^{4*}	в индивидуальном РНК ^{5*}
Poly(C)		270	6,4 ^{6*}	274	62,4	1,12	
Poly(C ₈₆ , εC ₁₄)	0,16	270	6,9 ^{7*}	275	49,0	0,96	
Poly(C ₅₅ , εC ₄₅)	0,46	272	7,8 ^{7*}	276,5	30,0	0,86	
Poly(C ₃₃ , εC ₆₇)	0,66	272	8,4 ^{7*}	280	22,6	0,79	0,80
Poly(C ₁₇ , εC ₈₃)	0,80	272	8,8 ^{7*}	283	16,7	0,82	0,80
Poly(C ₈ , εC ₉₂)		272	9,12 ^{6*}	284	14,0	0,83	
Poly(εC)			9,35 ^{7*}				
Poly(A)						1,00	1,00

^{1*} Степень модификации образцов poly(C, εC) определена по данным хроматографии.

^{2*} % определена по уравнению (4).

^{3*} Измерения проведены в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,2.

^{4*} Относительная интенсивность флуоресценции белка вируса табачной мозаики составляет 1,12.

^{5*} Результаты одинаковы в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,2 и 5,5.

^{6*} Значения ε определены по содержанию общего фосфора.

^{7*} Значения рассчитаны по уравнению (3).

$\pm 0,1) \cdot 10^3$ и получены расчетные формулы для $\epsilon^{\text{макс}}$ и κ сополимера poly(C, εC):

$$\epsilon_{\text{poly(C, \epsilon C)}}^{272} = 4,8 \cdot 10^3 \cdot \frac{D_{\text{poly(C, \epsilon C)}}^{272}}{D_{\text{изобест}}^{272}}, \quad (3)$$

$$\kappa = \frac{\epsilon_{\text{poly(C, \epsilon C)}}^{272} - 6,4 \cdot 10^3}{2,95 \cdot 10^3}. \quad (4)$$

Как видно из таблицы, значения κ для четырех препаратов сополимеров, вычисленные по уравнениям (3) и (4) и определенные экспериментально, совпадают в пределах точности измерений.

Введение этеногруппы в цитозинное ядро poly(C) приводит к изменению структуры полинуклеотида. Гипохромизм poly(C) и poly(εC) составляет 39 и 27% соответственно. С увеличением содержания этеноцитозиновых остатков в полинуклеотиде уменьшается оптическая активность главной положительной полосы КД (рис. 1, таблица). Уменьшение амплитуды эффекта Коттона при увеличении собственного УФ-поглощения указывает на уменьшение жесткости вторичной структуры полинуклеотида. Спектр КД poly(εC) в близкой УФ-области, по-видимому, имеет неконсервативный характер подобно спектру КД poly(C).

Сополимеры poly(C, εC) обладают слабой флуоресценцией в кислой среде. Спектры испускания флуоресценции poly(C₈, εC₉₂) и εСМР совпадают по форме и положению максимума, однако выход флуоресценции для poly(C₈, εC₉₂) в 20–30 раз меньше, чем для εСМР. Значительное уменьшение квантового выхода при переходе от εСМР к полимеру объясняется межплоскостными взаимодействиями соседних этеноцитозиновых оснований в полинуклеотидной цепи.

Зависимость интенсивности флуоресценции poly(C₈, εC₉₂) от pH имеет точку перегиба при pH 4,2 (данные не приводятся). Аналогичное значение pK_a для εСМР получено нами спектрофотометрически и флуоресцентным титрованием и совпадает с литературными данными [3]. Отсутствие сдвига pK_a основания при переходе от мономера к полимеру указывает на

то, что в кислой среде $\text{poly}(\epsilon\text{C})$ в отличие от $\text{poly}(\text{C})$ имеет форму одностежковой спирали. Этот вывод согласуется с предварительными данными о некооперативном характере плавления $\text{poly}(\text{C}_8, \epsilon\text{C}_{92})$ при pH 4,2.

Взаимодействие белка вируса табачной мозаики с сополимерами $\text{poly}(\text{C}, \epsilon\text{C})$ изучали в условиях, оптимальных для реконструкции РНК на основе синтетических полинуклеотидов [5]: белок и полинуклеотид смешивали в 0,1 М фосфатном буфере (pH 6,6) в концентрациях 2 и $6 \cdot 10^{-5}$ М соответственно и инкубировали при комнатной температуре в течение 12–18 ч. О появлении комплекса судили по отклонению от аддитивности спектров КД и флуоресценции смеси, а также на основании данных седиментационного анализа.

Метод КД позволил обнаружить образование комплекса белка вируса табачной мозаики с сополимерами средней и высокой степени модификации: в смесях белка с этими полинуклеотидами имеет место увеличение амплитуды КД в области 250–300 нм (рис. 2).

В случае $\text{poly}(\text{C})$ и $\text{poly}(\text{C}_{86}, \epsilon\text{C}_{14})$ спектры КД смеси были аддитивны, что свидетельствовало об отсутствии взаимодействия компонентов. Эти данные были подтверждены результатами седиментационного анализа: во всех смесях белка с полинуклеотидами, за исключением $\text{poly}(\text{C})$ и $\text{poly}(\text{C}_{86}, \epsilon\text{C}_{14})$, присутствовали тяжелые частицы с высокими коэффициентами седиментации. Изучение спектров флуоресценции показало, что в смеси белка вируса с каждым из сополимеров, но не с $\text{poly}(\text{C})$, имеет место тушение триптофановой флуоресценции белка, причем с увеличением степени модификации $\text{poly}(\text{C}, \epsilon\text{C})$ величина тушения флуоресценции возрастает и, по-видимому, достигает своего предельного значения для препаратов с $\kappa=0,65-0,92$ (таблица).

Совокупность полученных данных позволяет сделать некоторые заключения о взаимодействии белка вируса табачной мозаики с остатками цитидиловой кислоты полинуклеотидов как синтетических, так и природных. Очевидно, достройка второго цикла на цитозиновом ядре $\text{poly}(\text{C})$ способствует включению полинуклеотида в комплекс с белком вируса. Это включение объясняется, по-видимому, увеличением гидрофобности гетероциклического основания. Эффективность этеноаналогов $\text{poly}(\text{C})$ в реконструкции РНК указывает также на то, что NH_2 -группа и атом азота $\text{N}_{(3)}$ цитозинового ядра не взаимодействуют с белком при образовании комплексов с цитозинсодержащими полинуклеотидами. Более того, создается впечатление, что остатки цитидиловой кислоты полинуклеотида вообще не вносят вклада в стабилизацию структуры комплексов. Именно этим, по-видимому, объясняется результат с сополимером низкой степени модификации — $\text{poly}(\text{C}_{86}, \epsilon\text{C}_{14})$: взаимодействие белка с этеноцитидиловыми участками сополимера, регистрируемое методом флуоресценции, не стабилизируется взаимодействием с расположенными по соседству цитидиловыми последовательностями и не приводит к образованию РНК. Полученные результаты позволяют сделать важные выводы в отношении взаимодействия РНК с вирусным белком: очевидно, остатки цитидиловой кислоты РНК играют пассивную роль в стабилизации структуры комплексов с бел-

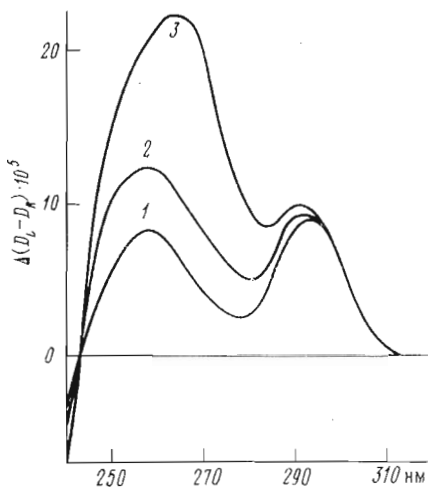


Рис. 2. Разностные спектры КД смесей белка вируса табачной мозаики ($2 \cdot 10^{-5}$ М) с полинуклеотидами ($6 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,6: 1 — $\text{poly}(\text{C}_{55}, \epsilon\text{C}_{45})$, 2 — $\text{poly}(\text{C}_{33}, \epsilon\text{C}_{67})$, 3 — $\text{poly}(\text{C}_{17}, \epsilon\text{C}_{83})$ и $\text{poly}(\text{C}_8, \epsilon\text{C}_{92})$

ком вируса, образующихся как на стадии инициации, так и на стадии элонгации реконструкции вируса.

Отсутствие данных о разности коэффициентах молярной экстинкции КД для РНП не позволяло оценить степень комплексообразования в смесях белка вируса табачной мозаики с сополимерами. В связи с этим количественные измерения величины тушения триптофановой флуоресценции проводили на индивидуальных РНП, реконструированных с участием $\text{poly}(\text{C}_{33}, \epsilon\text{C}_{67})$ и $\text{poly}(\text{C}_{17}, \epsilon\text{C}_{83})$. В настоящей работе были получены также РНП с сополимерами $\text{poly}(\text{C}_{55}, \epsilon\text{C}_{45})$ и $\text{poly}(\text{C}_8, \epsilon\text{C}_{92})$, однако тщательного изучения флуоресцентных свойств этих комплексов не проводили. При изучении влияния остатка этеноцитозина на флуоресцентные свойства белкового компонента комплекса в качестве контроля использовали РНП, содержащий $\text{poly}(\text{A})$.

Изучение флуоресцентных свойств РНП, содержащих $\text{poly}(\text{A})$, $\text{poly}(\text{C}_{33}, \epsilon\text{C}_{67})$ или $\text{poly}(\text{C}_{67}, \epsilon\text{C}_{83})$, показало (таблица), что в двух последних препаратах общая флуоресценция белка одинакова и в сравнении с таковой для РНП, содержащего $\text{poly}(\text{A})$, потушена на 20% за счет безызлучательной миграции энергии возбуждения с триптофановых на этеноцитозиновые остатки. Исходя из принятой нами ранее модели триптофановой флуоресценции белка и предположения о миграции энергии с остатка триптофана-52 ($\varphi \approx 0,35-0,45$), тушение флуоресценции этого остатка в РНП с $\text{poly}(\text{C}, \epsilon\text{C})$ составляет 25–30%. Это соответствует эффективности (E) передачи энергии, равной 0,25–0,30, и позволяет определить расстояние (R) между взаимодействующими триптофановым и этеноцитозиновым остатками по уравнению

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}, \quad (5)$$

где R_0 — Ферстеровский радиус миграции энергии для пары триптофановый остаток белка вируса табачной мозаики — этеноцитозиновый остаток $\text{poly}(\epsilon\text{C})$.

Значение R_0 может быть рассчитано по уравнению (5) [1]. При расчете R_0 использовали скорректированный спектр флуоресценции белка вируса [6] и рассчитанный нами спектр поглощения $\text{poly}(\epsilon\text{C})$. Для R_0 получили значение 15,7 Å (при $\chi^2 = 2/3$, $n = 1,33$ и $\varphi_{\text{ТР}} = 0,45$). Анализ влияния значений χ^2 , n и φ , используемых при расчете, и изменений формы и положения спектров $I(\nu)$ и $\epsilon(\nu)$ на величину R_0 позволяет оценить ошибку ΔR_0 в 2 Å.

Величина R , рассчитанная по уравнению (5), составляет 19 ± 2 Å. В работе [1] расстояние между остатком триптофана белка вируса табачной мозаики и этенодепиновым остатком $\text{poly}(\text{A}, \epsilon\text{A})$ в РНП было оценено в 17 ± 2 Å. Это означает, что данные для двух модельных систем хорошо согласуются и позволяют сделать вывод, что среднее расстояние между остатком триптофана (вероятно, триптофана-52) и областью связывания оснований РНП в вирусе составляет 17–20 Å. Этот вывод согласуется с результатами рентгеноструктурного анализа вируса с разрешением 4 Å [7].

Экспериментальная часть

Сополимеры $\text{poly}(\text{C}, \epsilon\text{C})$ получали обработкой $\text{poly}(\text{C})$ (Sigma) 10-кратным избытком хлорацетальдегида в 0,1 М ацетатном буфере, рН 5,0, при 50° в течение 1–10 сут. Полинуклеотид осаждали из реакционной смеси этаполом, промывали 2–3 раза и высушивали в вакуум-эксикаторе. Модификацию СМР проводили аналогично; $\epsilon\text{СМР}$ выделяли хроматографией на бумаге в системе изопропанол — NH_4OH — H_2O , 7 : 1 : 2; R_f СМР 0,08, R_f $\epsilon\text{СМР}$ 0,28. Степень модификации $\text{poly}(\text{C}, \epsilon\text{C})$ определяли по соотношению нуклеозидов после исчерпывающего гидролиза смесью щелочной фосфатазы *E. coli* (P. L. Biochemical) и фосфодиэстеразы змеи-

ного ядра (Worthington) в 0,03 М NH_4HCO_3 , 0,02 М MgCl_2 , рН 8,4. Нуклеозиды разделяли на аминокислоте А-7, элюируя 0,2 М HCOONH_4 (рН 5,0), используя жидкостный хроматограф высокого давления Varian, модель 8500.

Для расчета концентраций моно- и полинуклеотидов использовали коэффициенты молярной экстинкции, определенные по содержанию фосфора ($\epsilon_{\text{СМР}}^{273}$ $9,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, $\epsilon_{\text{СМР}}^{273}$ $1,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$), величины ϵ для полинуклеотидов приведены в таблице.

Титрование $\epsilon\text{СМР}$ и $\text{poly}(\text{C}_8, \epsilon\text{C}_{92})$ проводили в объеме 8–10 мл добавлением микроколичеств HCl без учета разбавления по изменению поглощения при 270 нм и интенсивности флуоресценции при 350 ($\lambda_{\text{возб}}$ 310 нм).

Образование комплексов белка вируса табачной мозаики с полинуклеотидами регистрировали методами КД и флуоресценции, как описано ранее [1]. РНП, реконструированные из белка вируса и сополимеров с κ 0,45; 0,67; 0,83 и 0,92, выделяли из реакционной смеси ультрацентрифугированием, очищали от свободных компонентов и низкомолекулярных комплексов 2–3-кратным переосаждением из 0,05 М NaCl , 0,01 М трис- HCl -буфера (рН 7,2) и растворяли в том же буфере. РНП имели коэффициенты седиментации 80–90S в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2) и 205–210S в 0,1 М фосфатном буфере (рН 5,5). Выделение РНП, содержащего $\text{poly}(\text{A})$, проводили аналогично.

Измерения поглощения, КД и флуоресценции проводили, как в работе [4].

Авторы приносят благодарность В. Е. Пискареву (Институт органической химии АН СССР) за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леднева Р. К., Разживин А. П., Богданов А. А., Кост А. А., Златкин И. В. (1979) Биоорган. химия, 5, 701–710.
2. Greenfield J. C., Leonard N. J., Gumpert R. I. (1975) Biochemistry, 14, 698–706.
3. Barrio J. R., Sattangi P. D., Gruber B. A., Dammann L. G., Leonard N. J. (1976) J. Amer. Chem. Soc., 98, 7408–7414.
4. Разживин А. П., Леднева Р. К., Терганова Г. В., Борисов А. Ю., Богданов А. А., Кост А. А. (1979) Биоорган. химия, 5, 691–700.
5. Fraenkel-Conrat H., Singer B. (1964) Virology, 23, 354–362.
6. Guttenplan J. B., Calvin M. (1973) Biochim. et biophys. acta, 322, 394–400.
7. Stubbs G., Warren S., Holmes K. (1977) Nature, 267, 216–224.

Поступила в редакцию
27.VII.1978

После доработки
9.XI.1978

INTERACTION OF TOBACCO MOSAIC VIRUS PROTEIN WITH SYNTHETIC POLYNUCLEOTIDES CONTAINING A FLUORESCENCE LABEL. III. OPTICAL PROPERTIES OF CYTIDYLIC AND 3, N⁴-ETHENOCYTIDYLIC COPOLYMERS AND THE ENERGY TRANSFER FROM TRYPTOPHAN TO POLY (C, ϵ C) ETHENOCYTOSINE RESIDUES IN RIBONUCLEOPROTEIN

LEDNEVA R. K., RAZJIVIN A. P.

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Optical properties of the cytidylic and 3,N⁴-ethenocytidylic acid copolymers, $\text{poly}(\text{C}, \epsilon\text{C})$, are described. The ϵC introduction into the polynucleotide promotes the complex formation between $\text{poly}(\text{C}, \epsilon\text{C})$ and tobacco mosaic virus protein. The quenching of the protein fluorescence in the complex indicates the energy transfer from a tryptophan to ethenoadenosine residues and provides the relevant distance of $19 \pm 2 \text{ \AA}$. Analysis of the fluorescence data for the two model system, i. e. complexes of tobacco mosaic virus protein with $\text{poly}(\text{A}, \epsilon\text{A})$ and $\text{poly}(\text{C}, \epsilon\text{C})$, permits to estimate the average distance between a tryptophan residue (presumably Trp^{52}) and the RNA binding region in the virus as $17\text{--}20 \text{ \AA}$.