

И. В. СКАРЛАТ, Н. О. КАЛИНИНА, В. А. ГИНЕВСКАЯ, В. И. АГОЛ

СИНТЕЗ ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ, ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА

(Представлено академиком А. И. Белозерским 24 IV 1970)

В последнее время высказывается предположение о том, что в клетках животных может отсутствовать механизм для внутренней терминации и инициации при синтезе белка на полицистронной мРНК; продуктом трансляции такой мРНК является непрерывная полипептидная цепь, включающая аминокислотные последовательности, соответствующие отдельным белкам. Функциональные белки образуются из первичного высокомолекулярного полипептида путем его вторичного расщепления («разрезания») на отдельные фрагменты. Основанием для этих представлений послужили результаты опытов, в кото-

рых

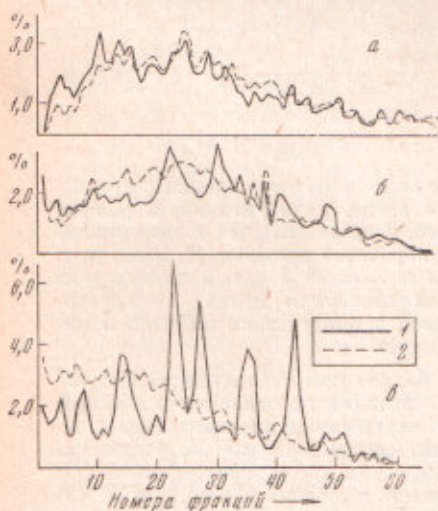


Рис. 1

Рис. 1. Образование вирус-специфических белков в зараженных клетках. Радиоактивность данной фракции по отношению к общей собранной радиоактивности. В разные сроки после начала инкубации к суспензиям зараженных (1) и незараженных (2) клеток добавляли меченые аминокислоты (валин, лейцин и фенилаланин) и инкубировали в течение 30 мин. К зараженным клеткам добавляли аминокислоты, меченные C^{14} (по $0,1 \mu C/мл$), а к незараженным — аминокислоты, меченные H^3 (по $0,5 \mu C/мл$). Меченые аминокислоты добавлены через 0 (а), 2 (б) и 4 (в) часа после начала инкубации при 37° . Экстракты из зараженных и незараженных клеток смешивали и подвергали коэлектрофорезу

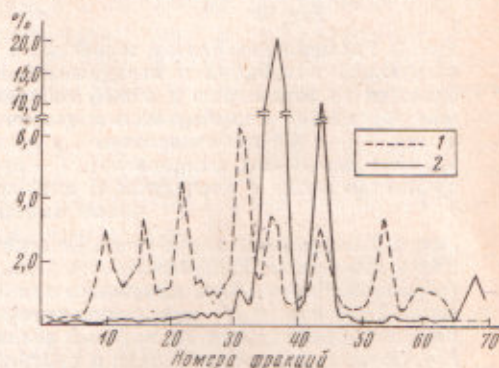


Рис. 2

Рис. 2. Сравнение белков, обнаруживаемых в цитоплазме зараженных клеток, и белков, входящих в состав зрелого вируса. Радиоактивность данной фракции по отношению к общей собранной. Экстракт из зараженных клеток (1), меченный H^3 -аминокислотами в течение 30 мин, после 4 час. инкубации при 37° , подвергали коэлектрофорезу с белками зрелого вируса (2), меченными C^{14} -аминокислотами

рых изучался синтез вирус-специфических белков в клетках, зараженных некоторыми пикорнавирусами (1-3). В связи с данной проблемой в настоящей работе исследовался синтез белков в клетках асцитной карциномы Кребс-II, зараженных вирусом энцефаломиокардита.

Клетки асцитной карциномы отмывали раствором Эрла, суспендировали в небольшом объеме стандартного буферного раствора (СБР) (4) и заражали вирусом из расчета 10 бо. е. на клетку. Через 30 мин. адсорбции при комнатной температуре суспензию разводили при помощи СБР до концентрации $2 \cdot 10^7$ кл./мл и оставляли на 14—16 час. при 4°. Затем клетки инкубировали при 37° с постоянным перемешиванием. В определенные периоды к клеткам добавляли меченые аминокислоты в количествах и на сроки, указанные в подписях под рис. 1—4. Для получения меченого ви-

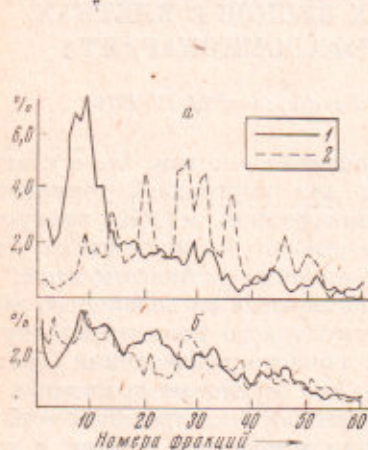


Рис. 3

Рис. 3. Расщепление белков, меченных в течение короткого времени, при последующей инкубации в нерадиоактивной среде. Радиоактивность данной фракции по отношению к общей собранной. Зараженные (а) и незараженные (б) клетки инкубировали в течение короткого времени (1 мин.— а и 2 мин.— б) с C^{14} -аминокислотами, а затем в течение 3 час. в присутствии избытка немеченых аминокислот. 1 — кратковременная метка, 2 — кратковременная метка с последующей инкубацией в присутствии избытка немеченых аминокислот

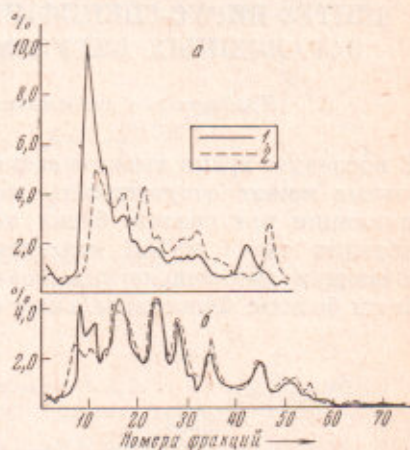


Рис. 4

Рис. 4. Расщепление вирус-специфических белков при последующей инкубации в гомогенате. Радиоактивность данной фракции по отношению к общей собранной. Через 4 часа инкубации при 37° зараженные клетки метили в течение 2 (а) или 30 (б) мин. радиоактивными аминокислотами. Из части суспензии получали экстракт, который анализировали путем электрофореза (1); другую часть гомогенизировали и инкубировали в течение 40 мин. при 37° (2)

руса зараженные клетки инкубировали с тремя мечеными по C^{14} аминокислотами (фенилаланин, лейцин и валин; по 0,2 μ С/мл). Через 7 час. инкубации при 37° клетки разрушали трехкратным замораживанием и оттаиванием, клеточный детрит удаляли низкоскоростным центрифугированием, экстракт обрабатывали 5 раз фреоном и водную фазу наслаивали на 2 мл 1,8 М сахарозы. После центрифугирования в течение 3 час. при 25 000 об/мин (центрифуга MSE High Speed 50, ротор 3×20 мл) вирус собирали со дна пробирки.

Подготовку препаратов для электрофореза и сам электрофорез в нейтральном, содержащем 0,1% додецилсульфата Na, 10% полиакриламидном геле проводили так, как описано ранее (5). Затем гель разрезали на сегменты толщиной 1 мм, их переносили во флаконы, добавляли туда по 0,5 мл 0,3% додецилсульфата Na и через 14—16 час. элюции при 37° добавляли 10 мл полярного сцинтиллятора (6). Пробы просчитывали через 6—10 час. в жидкостном сцинтилляционном счетчике фирмы «Нуклеар Чикаго» (Марк I или Юнилак). В случае одновременного счета H^3 и C^{14} в тритиевом канале регистрировалось около 10% активности C^{14} , а в углеродном канале — менее 1% активности H^3 .

Препараты, использованные для приготовления геля, а также додецилсульфат Na были перекристаллизованы, а мочеви́на подвергнута деионизации. Радиоактивные аминокислоты обладали следующими удельными активностями ($\mu\text{C}/\text{ммоль}$): C^{14} -фенилаланин 118, C^{14} -лейцин 80, C^{14} -валин 105, H^3 -фенилаланин 1590, H^3 -лейцин 12 600, H^3 -валин 405.

В первой серии опытов к суспензиям зараженных и незараженных клеток на разных сроках инкубации при 37° добавляли на 30 мин. меченые аминокислоты; синтезировавшиеся за это время белки анализировали путем электрофореза. Как показывает рис. 1, уже через 2 часа инкубации можно отметить появление белков, отсутствующих в незараженных клетках, но наиболее отчетливо синтез вирус-специфических белков удается зарегистрировать через 4 часа инкубации; при этом выявляется не менее восьми отдельных радиоактивных пептидов. По крайней мере два вирус-специфических пептида, обнаруживаемые в зараженной клетке, соответствуют по электрофоретической подвижности структурным белкам, выделенным из зрелого вируса (рис. 2). Следует обратить внимание на то, что в экстракте из зараженных клеток не удается обнаружить компонента с подвижностью, соответствующей подвижности низкомолекулярного минорного пептида, входящего в состав вирусной частицы.

Если зараженные клетки инкубируются с мечеными аминокислотами очень короткое время (1—2 мин.), то почти вся радиоактивность обнаруживается в белке (или белках) с малой электрофоретической подвижностью (см. рис. 3а) и, следовательно, высоким молекулярным весом, так как при использованном способе электрофореза разделение белков происходит в соответствии с их молекулярными весами, а не зарядами (¹). Если же после кратковременной инкубации с мечеными аминокислотами прекратить дальнейшее включение радиоактивности в синтезируемые белки (путем добавления 100-кратного избытка соответствующих немеченых аминокислот) и проинкубировать клетки еще в течение некоторого времени, то наблюдается перераспределение радиоактивности; радиоактивность переходит из высокомолекулярного пептида (пептидов) в «зрелые» вирус-специфические белки (рис. 3а). В незараженных клетках таких различий в характере радиоактивных пептидов, образующихся при кратковременной и при длительной метке, не обнаруживается (рис. 3б).

Таким образом, полученные данные подтверждают предположение о том, что первичным продуктом трансляции полицистронной РНК пикорнавирусов является высокомолекулярный пептид (или пептиды), который в дальнейшем расщепляется на функциональноактивные белки. Возможно, что помимо первоначального расщепления первичного пептида на более поздних стадиях формирования вирусной частицы имеет место дальнейшее «разрезание» пептидов на еще более мелкие фрагменты (²); в частности, таким образом можно объяснить наличие в составе зрелых вирусных частиц пептида, который не обнаруживается в экстракте зараженных клеток (рис. 2).

Особый интерес представляет природа расщепления высокомолекулярного первичного полипептида. Проще всего предположить, что оно осуществляется протеазами. Однако нужно объяснить высокую специфичность протеолитического расщепления, приводящего к образованию функциональных белков. Специфичность расщепления может быть обусловлена либо высокой специфичностью соответствующих протеаз, либо особенностями третичной структуры высокомолекулярного полипептида. Можно, например, предположить, что этот пептид образует несколько глобул («ядер») и что протеазы расщепляют участки между глобулами. Одним из подходов к обсуждаемой проблеме является изучение расщепления высокомолекулярного полипептида в бесклеточной системе.

Зараженные клетки инкубировали с мечеными аминокислотами в течение 2 мин., — при этом метка включалась в высокомолекулярный полипептид. Далее клетки гомогенизировали, и безъядерный гомогенат инкуби-

ровали в отсутствие меченых аминокислот при 37° в течение 40 мин. Как показывает рис. 4а, при инкубации гомогената происходит частичное разрушение высокомолекулярного полипептида и появление пиков пептидов-фрагментов. Это расщепление является специфичным в том смысле, что оно практически не затрагивает «зрелых» вирус-специфических пептидов (рис. 4б). Дальнейшие исследования должны выяснить как природу ферментов, ответственных за расщепление вирус-специфического полипептида, так и причины, обуславливающие специфичность этого процесса.

Приносим благодарность Т. Николаевой, принимавшей участие в постановке некоторых опытов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
20 IV 1970

Институт полиомелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. F. Summers, J. V. Maizel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 59, 966 (1968).
² J. J. Holland, E. D. Kiehn, *ibid.*, 60, 1015 (1968). ³ M. F. Jacobson, D. Baltimore, *ibid.*, 61, 77 (1968). ⁴ E. M. Martin, J. Malec et al., Biochem. J., 80, 585 (1961). ⁵ D. F. Summers, J. V. Maizel, J. E. Darnell, Proc. Nat. Acad. Sci., 54, 505 (1965). ⁶ V. I. Agol, G. Y. Lipskaya et al., Virology, 40, 4 (1970).
⁷ A. L. Shapiro, E. Viñuela, J. V. Maizel, Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 815 (1967).