

УДК 576.858

ВИРУСОЛОГИЯ

Ф. И. ЕРШОВ, В. С. ГАЙЦХОКИ, О. И. КИСЕЛЕВ, Л. К. МЕНЬШИХ,
О. В. ЗАЙЦЕВА, Л. В. УРЫБАЕВ, С. А. НЕЙФАХ,
действительный член АМН СССР В. М. ЖДАНОВ

СИНТЕЗ ИНФЕКЦИОННЫХ ВИРУСНЫХ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДОВ В ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЯХ

Нами в работе (¹) было обнаружено, что инфекционная РНК вируса венесуэльского энцефаломиеелита лошадей (вируса в.э.л.) проникает в изолированные митохондрии печени крысы, подавляет транскрипцию митохондриальной ДНК и сама становится матрицей для вирусспецифических синтезов РНК и белка за счет энергии, генерируемой митохондриями. Однако тогда не были представлены доказательства образования митохондриями полного репликативного комплекса и конечного продукта синтеза — инфекционных рибонуклеопротеидов, обладающих инфекционными свойствами. Настоящая работа имела целью получить ответ на вопросы о том, способны ли митохондриальные рибосомы «бактериального» типа (²) синтезировать полноценную вирусспецифическую РНК-полимеразу и могут ли изолированные митохондрии обеспечить полную репликацию вирусных геномов на вирусспецифических матрицах, включенных в митохондрии.

Задача состояла в том, чтобы установить, образуются ли в «зараженных» митохондриях все типы вирусспецифических РНК, включая вирионную РНК с константой седиментации 40 S. Для этого сначала требовалось исследовать динамику синтеза тотальной вирусной РНК. К печеночным митохондриям крысы добавляли немеченую вирусную РНК (50 μ л), полученную по (³), и после 30-минутного контакта при 0° инкубировали при 37° с импульсной меткой C¹⁴-предшественниками РНК в присутствии эффективной концентрации актиномицина D (50 μ г/мл). Импульсную метку вносили через различные промежутки времени после начала инкубации митохондрий с немеченой вирусной РНК (0—20, 20—40, 40—60, 60—80, 80—120 мин.). Применявшаяся при этом концентрация актиномицина D почти полностью исключала возможность ДНК-зависимого синтеза митохондриальной РНК (⁴) и следовательно, меченые предшественники могли включаться только в синтезируемые *de novo* вирусные РНК.

Включение C¹⁴-предшественников в РНК, рассчитанное в имп/мин на единицу оптической плотности РНК при 260 м μ , соответственно было следующее: 1600, 2200, 3800, 1500, 500.

Таким образом, синтез вирусспецифических РНК достигает максимума к 60 мин. инкубирования, а затем наступает постепенное падение интенсивности синтеза.

Остальную часть тотальной вирусной РНК, экстрагированной из митохондрий в различные промежутки времени после инкубирования, подвергали центрифугированию в градиенте концентрации сахарозы (5—30% на буферном растворе: трис-HCl pH 7,2; 0,1 M NaCl; 10⁻³ M ЭДТА. Центрифуга Спинко Л2. Ротор SW 25-1, 18 000 об/мин, 12 час.).

На диаграмме седиментации (рис. 1), видно, что радиоактивность распределяется в виде гомогенного пика 40 S и гетерогенной области 26—20 S, причем радиоактивный материал в зоне 20 S характеризуется частичной резистентностью к воздействию РНКазой. Фракция меченой

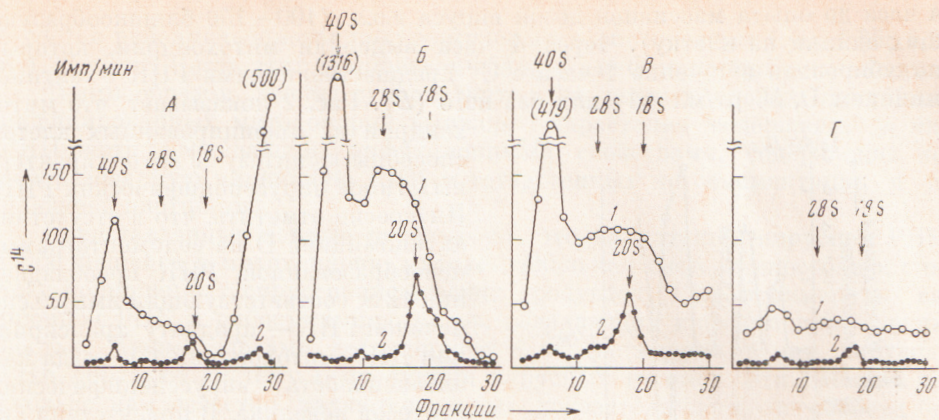


Рис. 1. Динамика синтеза вирусных РНК по данным седиментационного анализа. Аликвоты каждой фракции градиента обрабатывали РНКазой (Worthington) 10 мкг/мл, 15 мин. 1 — пробы без обработки РНКазой, 2 — после РНКазы. Сроки импульсной метки (от начала инкубации митохондрий при 37°): А = 20—40 мин., В = 40—60 мин., С = 60—80 мин., Д = 80—120 мин.

РНК, устойчивой к РНКазе, составляет на всех сроках инкубации приблизительно 5—10% от общего количества синтезированной РНК. Таким образом, градиентное центрифугирование обнаруживает синтез трех типов вирусспецифических РНК с константами седиментации 40, 26 и 20 S. При этом фракция 20 S, очевидно, соответствует репликативной форме РНК, которая обычно обнаруживается в клетках, инфицированных вирусом в.э.л., и имеет двухнитчатую структуру, резистентную к РНКазе (⁷). Динамика синтеза вирусных РНК, по данным седиментационного анализа (рис. 1) и по данным определения тотальной радиоактивности РНК (см. выше), хорошо согласуется. Действительно, максимальное количество пиков 40, 26 и 20 S синтезируется в интервале 40—60 мин., а к 120 мин. пиков радиоактивности почти не выявляется.

Вирусная природа синтезированных РНК подтверждена и опытами по молекулярной гибридизации, которые не выявили гомологии новообразованной C¹⁴-РНК с ДНК митохондрий.

Следовательно, митохондрии печени крысы, инфицированные РНК вируса в.э.л., синтезируют три типа вирусспецифических РНК.

Аналогичный результат был получен и на другой системе — на митохондриях, выделенных из куриных фибробластов, инфицированных за

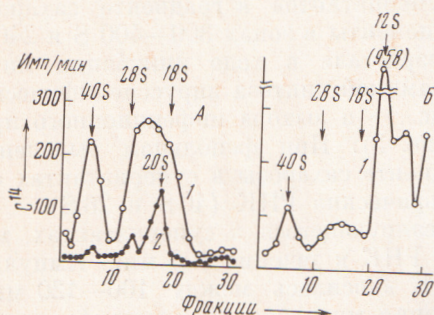


Рис. 2

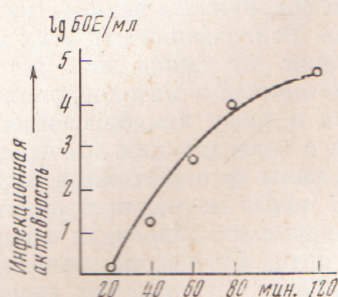


Рис. 3

Рис. 2. Синтез вирусспецифических РНК в митохондриях, выделенных из инфицированных фибробластов куриных эмбрионов. А — в присутствии актиномицина D, В — без актиномицина D; обозначения кривых те же, что на рис. 1

Рис. 3. Инфекционная активность супернатантов после инкубации митохондрий с вирусной РНК

4 часа до опыта массивной дозой вируса в.э.л. (100—150 бляшкообразующих единиц на клетку). Через 4 часа выделяли митохондрии, которые инкубировали в течение 1 часа с C^{14} -предшественниками РНК с актиномицином D, 50 $\mu\text{г}/\text{мл}$ (А) или без него (Б). Рис. 2 показывает, что митохондрии из инфицированных клеток способны к синтезу de novo характерных типов вирусспецифических РНК. Интересно отметить, что в отсутствие актиномицина D на седиментограмме новообразованной РНК преобладает пик 12 S, соответствующий импульсно меченой РНК — продукту транскрипции ДНК митохондрий ⁽⁶⁾, тогда как интенсивность вирусспецифических синтезов невелика. В присутствии актиномицина синтез 12 S-РНК был резко подавлен, а синтез вирусспецифических РНК — значительно более выражен. Такие результаты, по-видимому, можно объяснить конкуренцией вирусных и митохондриальных матричных РНК за рибосомы, т. е. конкуренцией на уровне трансляции.

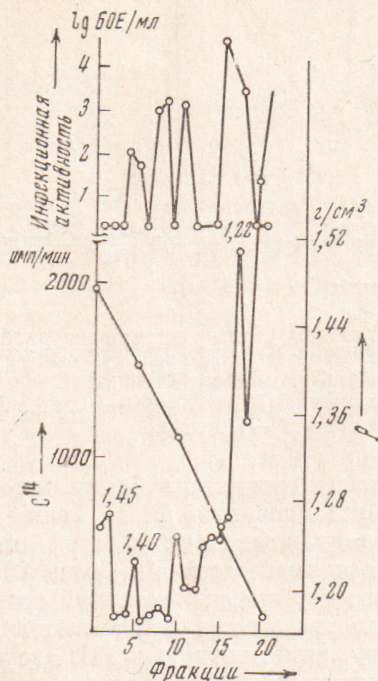


Рис. 4. Плотностная характеристика новообразованных рибонуклеопротеидных частиц супернатанта после инкубации митохондрий

Поскольку, как показано выше, изолированные митохондрии способны к осуществлению цикла репликации инфекционной вирусной РНК, представляло существенный интерес выяснить природу конечных продуктов этих вирусспецифических синтезов, в частности их инфекционную активность, седиментационные и плотностные характеристики.

На рис. 3 представлена динамика нарастания инфекционного титра в супернатантах, полученных после инкубации митохондрий с вирусной РНК. Резкое возрастание инфекционной активности в ходе инкубации до 4,7 логарифмов бляшкообразующих единиц (б.о.е.) к 120 мин. коррелирует с изменением скоростей синтеза вирусспецифических РНК в митохондриях (см. рис. 1).

При седиментационном анализе супернатантов в градиенте сахарозы были обнаружены радиоактивные компоненты в зонах 300—400 S и 240—260 S. Радиоактивность этих пиков возрастала в ходе инкубации митохондрий, что также согласуется с динамикой синтеза вирусспецифического материала в митохондриях (см. рис. 1) и выхода инфекционного продукта в среду инкубирования (см. рис. 3). При фенольном выделении РНК с последующим анализом в градиенте сахарозы в супернатантах обнаружены радиоактивные вирусспецифические РНК (40 S и 26 S).

С целью изучения продукта, синтезирующегося в супернатантах, митохондрии инкубировали с вирионной РНК в течение 120 мин. Импульсная метка C^{14} -предшественниками РНК вносилась между 100—120 мин. инкубации. Супернатант после осаждения митохондрий центрифугировали в преформированном градиенте плотности хлористого цезия в бакет-роторе 3×5 ультрацентрифуги MSE в течение 8 час. при 36 000 об/мин. Фракции анализировали на радиоактивность и на инфекционную активность. Плотность фракций определяли с помощью рефрактометра.

При равновесном центрифугировании супернатантов в градиенте плотности хлористого цезия (рис. 4) показано, что радиоактивная РНК входит

в состав рибонуклеопротеидных комплексов с плотностями 1,40; 1,35; 1,33 и 1,22 г/см³. Часть этих комплексов обладала инфекционной активностью.

Таким образом, анализ супернатантов на разных сроках инкубации инфицированных митохондрий выявляет нарастание содержания в них РНП-частиц, обладающих инфекционными свойствами, содержащих новообразованную вирионную РНК и гетерогенных по седиментации и по плавучей плотности.

Представленные данные показывают, что на матрице вирусной РНК, включившейся в митохондрии, митохондриальная система способна к синтезу полноценных вирусспецифических продуктов: РНК-полимеразы, вирионной РНК и рибонуклеопротеидов, обладающих инфекционной активностью. Иными словами, митохондрии и включившаяся в них вирусная РНК образуют систему репродукции вирусных геномов. Эти данные, насколько нам известно, являются первым доказательством способности белок-синтезирующей системы и системы, генерирующей АТФ, митохондрий к синтезу биологически активных реплицирующихся структур, программированному вирусной матрицей.

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского
Академии наук СССР
Москва

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

Поступило
5 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. С. Гайцхоки, Ф. И. Ершов и др., ДАН, **201**, № 1 (1971). ² S. Nass, Intern. Rev. Cytol., **25**, 55 (1967). ³ Ф. И. Ершов, В. М. Жданов, Л. В. Урываев, Вопр. вирусол., **5**, 551 (1969). ⁴ В. С. Гайцхоки, О. И. Киселев и др., Биохимия, **36**, 61 (1971). ⁵ Д. Сабалош, Биохимия, **36**, № 2 (1971). ⁶ Л. С. Рахимбекова, В. С. Гайцхоки, Мол. биол., **3**, 315 (1969). ⁷ V. M. Zhdanov, F. I. Yershov, L. V. Uryvaev, Virology, **38**, 355 (1969).