

А. Г. БУКРИНСКАЯ, В. М. ЗАЙДЕС,
действительный член АМН СССР В. М. ЖДАНОВ

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНОМА ПАРАМИКСОВИРУСА В СОСТАВЕ НУКЛЕОКАПСИДА

Ранее было показано, что нуклеокапсид вируса Сендай проникает в зараженные клетки и на ранней стадии инфекции обнаруживается в цитоплазме в ассоциации с вирусиндуцированной РНК и функционирующими полисомами (¹⁻³).

В настоящей работе приводятся данные в пользу того, что вирусиндуцированная РНК в этих структурах является продуктом транскрипции

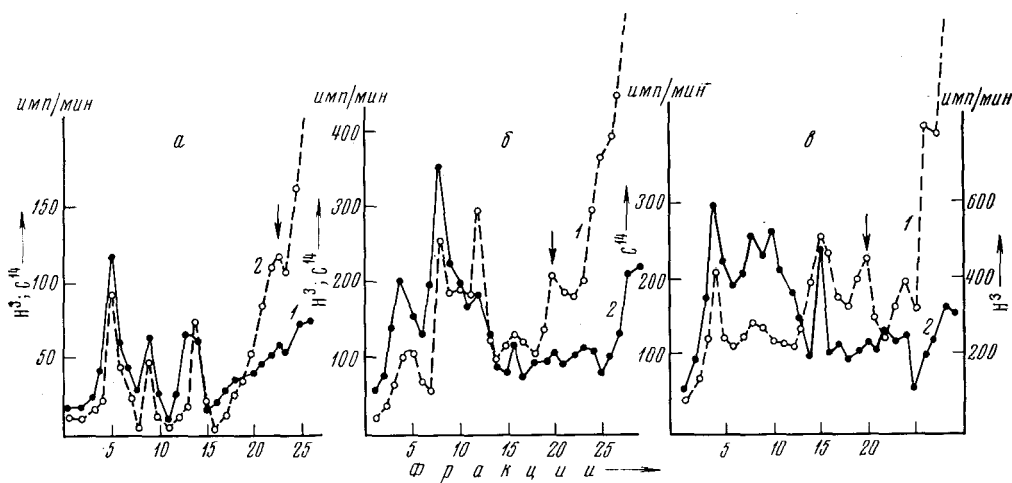


Рис. 1. Седиментационное фракционирование цитоплазматических экстрактов из зараженных клеток. Цитоплазматические экстракты получали из необработанных (а и б) и отработанных циклогексимидом (в) зараженных клеток. Экстракты центрифугировали в градиенте концентрации сахарозы (17—40%), на дно пробирок помещали 2 мл 60% сахарозы; ротор SW 25.1 центрифуги «Spinco», 24 000 об/мин, 2 часа 20 мин., 4°. Кислоторастворимую радиоактивность определяли в аликвотах фракций при условиях, когда 8% C^{14} -радиоактивности просчитывалось в канале для H^3 . Распределение родительской вирусной РНК (а, кривая 1), родительского вирусного белка (б и в, кривая 2) и вновь синтезированной РНК (а, кривая 2; б и в, кривая 1) 1 — H^3 -радиоактивность, 2 — C^{14} -радиоактивность. Стрелками указано положение монорибосом в градиентах

родительской РНК в составе нуклеокапсида, которая осуществляется вирусной РНК-полимеразой.

Клетки асцитной карциномы Эрлиха, предварительно обработанные активомидином D, заражали вирусом Сендай, меченным H^3 -уридином (рис. 1а) или C^{14} -аминокислотами (рис. 1б, в), как было описано (^{1, 2}), и через 1 час после заражения добавляли соответственно C^{14} уридин или H^3 -уридин (10 μ С/мл) на 30 мин. Клетки разрушали гомогенизацией (²) или с помощью 0,5% раствора неионного детергента NP_4O , и цитоплазматический экстракт анализировали в градиенте плотности сахарозы с последующим рецентрифугированием фракции (после фиксации 4% формалином) в преформированном градиенте хлористого цезия. Анализ

материала в градиентах плотности сахарозы и хлористого цезия проводили так, как было описано ранее ⁽²⁾, за исключением того, что материал фракций сахарозного градиента равномерно распределяли между «тяжелым» и «легким» растворами хлористого цезия, показатель преломления этих растворов сравнивали с преломлением контрольных растворов, не содержащих материал и сахарозу, и различие в показателях преломления рассматривали как поправку, которую вычитали из показателя преломле-

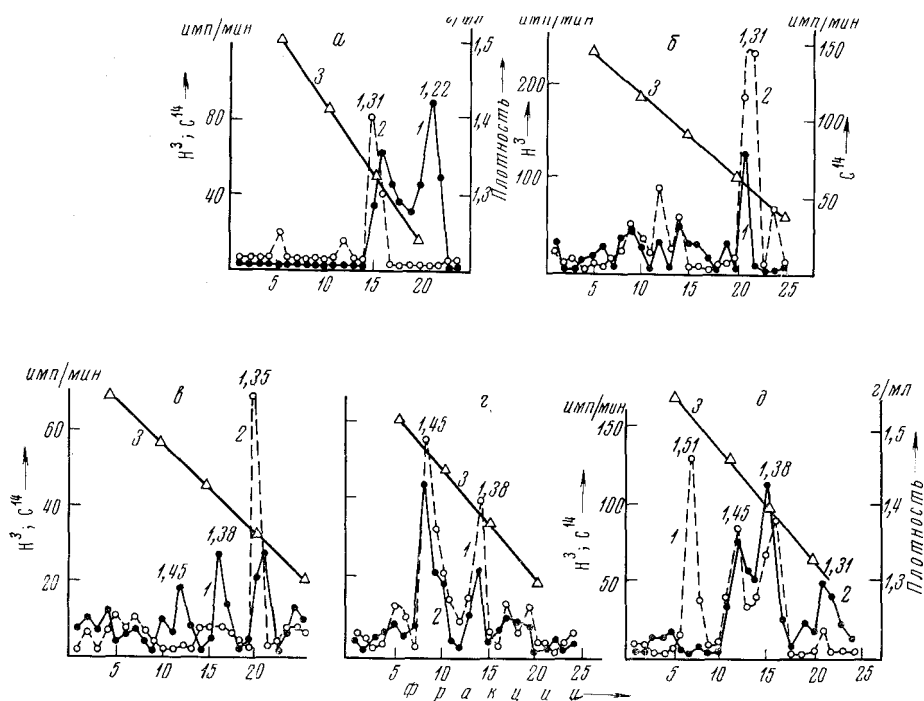


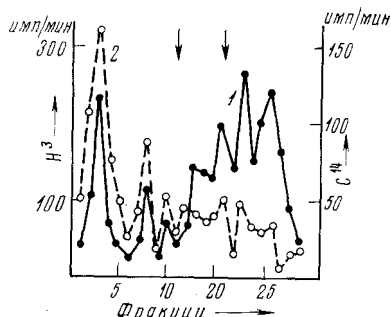
Рис. 2. Плотностное фракционирование структур цитоплазматического экстракта. а, б, в — фракции 5, 9 и 14 градиента, представленного на рис. 1а; г — фракция 16 градиента, представленного на рис. 1б; д — фракция 15 градиента, представленного на рис. 1в. 1 — H^3 -радиоактивность, 2 — C^{14} -радиоактивность, 3 — плотность (в г/мл)

ния фракций градиента хлористого цезия. В специальном опыте было показано, что при данных условиях плотностью сахарозы можно пренебречь, поскольку структуры с известной плавучей плотностью (например, клеточные моносомы) занимают характерное для них положение (1,55 г/мл) с учетом поправки на преломление использованного раствора сахарозы.

Из рис. 1а и б видно, что профиль радиоактивности вновь синтезированной РНК через 90 мин. инфекции совпадает с профилем радиоактивности родительской вирусной РНК (а) и родительского белка (б), и радиоактивность распределяется в структурах четырех типов с коэффициентами седиментации примерно 260S и больше, 210S, 180S и 150S. При анализе фракций, соответствующих пикам радиоактивности, в градиенте хлористого цезия было показано, что структура 260S содержит два родительских компонента с плавучей плотностью 1,22 г/мл, соответствующей вирионам Сендай, и 1,31 г/мл, соответствующей вирусному нуклеокапсиду (рис. 2а), структура 210S содержит один компонент с плавучей плотностью 1,31 г/мл (рис. 2б), структура 180S — компоненты с плавучей плотностью 1,35 и 1,38 г/мл и структура 150S — компоненты с плавучей плотностью 1,38 и 1,45 г/мл (рис. 2в, г). Ранее нами было показано, что

компоненты 1,35 и 1,38 г/мл представляют собой модифицированный вирусный нуклеокапсид, возникающий в результате деспирализации и частичной депротеинизации проникшего в цитоплазму вирусного нуклеокапсида, а компонент 1,45 г/мл представляет собой модифицированный вирусный нуклеокапсид, ассоциированный с рибосомами (¹, ²). Поскольку быстро метящаяся вирусспецифическая РНК обнаруживалась в структурах типа нуклеокапсида (рис. 2), возникало предположение, что транс-

Рис. 3. Седиментационное фракционирование РНК, выделенной из структур цитоплазматического экстракта. Цитоплазматический экстракт из клеток, зараженных как указано на рис. 1а, центрифугировали при 100 000 g, РНК экстрагировали из осадка 0,5% додецилсульфатом натрия и фенолом и центрифугировали в градиенте плотности сахарозы (5—20%) в центрифуге «Суперспид», ротор 3×20, при 16 000 об/мин в течение 16 час. при 4°. 1—¹⁴C-радиоактивность, 2—³H-радиоактивность; стрелками указано положение 28S и 18S рибосомных РНК



крипция РНК осуществляется именно в этих структурах. В соответствии с этим предположением часть выделенной из структур вирусиндуцированной РНК седиментировала в ассоциации с родительской РНК в положении 45—50S (рис. 3), соответствующем транскриптивной промежуточной форме парамиксовирусов (⁴, ⁵).

Транскрипция вирусного генома могла осуществляться с помощью вирионной РНК-полимеразы, описанной недавно у парамиксовирусов (⁶⁻⁸). Для проверки этого предположения к клеткам одновременно с вирусом добавляли ингибитор белкового синтеза циклогексимид в концентрации 100 мкг/мл, подавляющей белковый синтез на 95%. В этих условиях количество вирусиндуцированной РНК не только не уменьшалось, но даже несколько увеличивалось; структуры, содержащие РНК, имели такую же плавающую плотность, как и в клетках без циклогексимиды, и содержали дополнительный компонент с плавающей плотностью 1,51 г/мл (по-видимому, вирусспецифические полисомы) (рис. 2б).

Полученные результаты дают основание полагать, что внутриклеточные нуклеокапсидные структуры содержат активную вирионную РНК-полимеразу и участки вирионной РНК, доступные для транскрипции.

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

Поступило
24 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. G. Bukrinskaya, V. M. Zhdanov, G. V. Vorkunova, J. Virology, 4, 141 (1969).
- ² A. G. Bukrinskaya, A. F. Bikovskii, V. M. Zhdanov, Virology, 39, 705 (1969).
- ³ А. Г. Букринская, В. М. Жданов, Мол. биол., 4, 313 (1970).
- ⁴ W. S. Robinson, Virology, 44, 494 (1971).
- ⁵ L. A. Clavell, M. A. Bratt, J. Virology, 8, 500 (1971).
- ⁶ A. S. Huang, D. Baltimore, M. A. Bratt, J. Virology, 7, 389 (1971).
- ⁷ H. O. Stone, A. Portner, D. W. Kingsbury, J. Virology, 8, 174 (1971).
- ⁸ W. S. Robinson, J. Virology, 8, 81 (1971).