

Член-корреспондент АН СССР Г. П. ГЕОРГИЕВ, О. П. САМАРИНА, И. С. ИРЛИН

СВОЙСТВА ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ РНК В КЛЕТКАХ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ПОЛИОМЫ

Известно, что в клетках, трансформированных вирусом полиомы, равно как и другими онкогенными вирусами, геном вируса встраивается в геном хозяина (¹, ²). Для объяснения механизма, посредством которого это событие ведет к раковому превращению клеток, были предложены различные гипотезы. Согласно модели, выдвинутой одним из нас (³), геном вируса встраивается в середину единицы транскрипции хозяина, разделяя акцепторную и структурные зоны оперона. Вирусный геном вносит новый промотор, в результате чего образуется новая единица транскрипции, начинающаяся последовательностями, относящимися к вирусной РНК, и закачивающаяся структурным геном (генами) хозяина. Поскольку акцепторная, регуляторная зона исходного оперона разобщена со структурными генами, транскрипция последних становится неконтролируемой.

Согласно этой модели, новообразованная вирус-специфическая РНК должна входить в состав высокомолекулярных ДНК-подобных РНК-предшественников, находясь у их 5'-конца, а у 3'-конца последних должны располагаться РНК хозяина. В настоящей работе показано, что вирус-специфическая РНК в клетках, трансформированных вирусом полиомы, входит в состав высокомолекулярных РНК, значительно превышающих размеры полного генома вируса.

Методика. В работе была использована перевивная линия клеток хомячковой эмбриональной ткани, трансформированная вирусом полиомы. Клетки культуры не образовывали вирус полиомы в той или иной форме, но содержали внутриядерный вирус — специфический Т-антиген и поверхностный вирус — индуцированный трансплантационный антиген. Эта культура, носящая название штамм 874, была подробно описана нами ранее (⁴). Для опыта клетки выращивались в литровых флаконах в среде 199 с 10% бычьей сыворотки. Урожай клеток с одного флакона составлял величину 30—40·10⁶ живых клеток. При инкубации с меткой клетки предварительно снимали со стекла версеюном и ресуспендировали в небольшом объеме среды Игла.

Добавляли уридин-Н³ («Amersham», Англия, 22 С/ммоль) в количестве 10 мкС на 1 мл среды и инкубировали клетки 2,5 часа при 37°.

Клетки собирали центрифугированием, замораживали и хранили при —70°. Для выделения РНК использовали метод Шеррера и Даршалла (⁵). 4 г замороженных клеток быстро оттаивали в 20 мл 0,14 М NaCl, взбалтывали с 230 мл 0,01 М NaCl — 0,01 М ацетатом Na, pH 5,1, добавляли 1/10 объема 20% додецилсульфата Na (ДСН) и немедленно вслед за тем 250 мл горячего фенола (~65°). Дальнейшее выделение вели по той же прописи (⁵). Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой («Whorthington», свободная от следов РНКазы), повторно депротеинизировали и ультрацентрифугировали в ультрацентрифуге «Spinco L2» 11 час. при 25 000 об/мин (при 4°). Собирали фракции >45S, 30—45S, 20—30S и <18S. Каждую фракцию обрабатывали макалоидом, переосаждали спиртом и использовали для гибридизации.

Гибридизацию вели по методу Курильского с соавторами (⁶). РНК (5—15·10⁶ имп/мин) растворяли в 0,5 мл 8 М мочевины — 4 × SSC

Таблица 1

Распределение вирус-специфической РНК между фракциями клеточной РНК, синтезированной в течение двухчасовой инкубации клеток с уридином-Н³

Фракция РНК	Общая активность (имп/мин) $\times 10^{-6}$	Удельная активность, (имп/мин на 1 $\mu\text{г}$) $\times 10^{-3}$	Содерж. вирус-специфич. РНК $\times 10^{-5}$ (в %)	Общая активность, приходящая на вирус-специфич. РНК	
				имп/мин	% от общей меченой РНК
>45 S	30	22	1,2	360	24
30—45 S	59	7,4	0,78	460	30
20—30 S	36	2,2	1,02	370	25
<20 S	24	3,4	1,34	320	21

(SSC = 0,15 M NaCl — 0,015 M цитрат Na, pH 7) — 0,1% ДСН и добавляли в раствор миллипоровые фильтры диаметром 3 мм, содержащие от 3 до 20 $\mu\text{г}$ денатурированной ДНК полиомы и фильтры с таким же количеством ДНК *Escherichia coli*. Отжиг вели в течение 3—6 суток при 41°. После этого фильтры извлекали, прополаскивали избытком $4 \times \text{SSC}$ и инкубировали с 4 мл 8 M мочевины — $4 \times \text{SSC}$ — 0,1% ДСН при 41°. Далее фильтры промывали еще 3 раза в новой порции той же среды и затем несколько раз большими объемами $4 \times \text{SSC}$ — 0,1% ДСН и $2 \times \text{SSC}$. Промытые фильтры, содержащие ДНК вируса полиомы и *E. coli*, отдельно обрабатывали 0,2 мл раствора РНКазы, 50 $\mu\text{г}/\text{мл}$ в $2 \times \text{SSC}$. Гидролизат (0,2 мл) непосредственно наносили на стеклянный фильтр BF/G и высушивали. Фильтры дополнительно отмывали $2 \times \text{SSC}$ и $1 \times \text{SSC}$ при комнатной температуре. Затем все фильтры просчитывали в толуоловом сцинтиллаторе на счетчике «Packard Mark» 2 или «Iitertechnique» SL-40.

Результаты исследования и обсуждение. В табл. 1 представлено распределение по фракциям общей новообразованной РНК трансформированных клеток и содержание в них вирус-специфической РНК. Метка распределяется между всеми фракциями с максимумом в зоне 30—45S. Следует учитывать, однако, что в этой области находится основная часть новообразованной рРНК. Все фракции содержат в своем составе и вирус-специфическую РНК. Ее доля в общей новообразованной РНК невелика и составляет лишь около 0,001% во всех седиментационных фракциях. Несколько ниже ее процентное содержание в зоне 30—40S, поскольку в этой фракции большая доля метки приходится на рРНК. Общая активность вирус-специфической РНК примерно одинакова во всех фракциях. Следует подчеркнуть, что более половины вирус-специфической РНК входит в состав цепей с молекулярным весом $0,6 \cdot 10^6$, а около четверти ее выявляется в зоне >45S, т. е. в области РНК с молекулярным весом $> 4,5 \cdot 10^6$. Максимальная величина цепи РНК, транскрибированной с полного генома вируса полиомы, составляет $1,5 \cdot 10^6$, что существенно ниже приведенных величин. Эта разница еще более усилится, если учесть, что в трансформированных клетках транскрибируется не весь геном полиомы, а лишь часть его, преимущественно «ранние» гены⁽⁷⁾. Следовательно, отрезки вирус-специфической РНК являются частями более крупных цепей РНК. Вероятно, в их состав входят отрезки хозяйской РНК. В противном случае, если допустить, что транскрибируется несколько вирусных геномов в виде одной цепи РНК, то должны транскрибироваться все гены, что на самом деле не происходит.

Примененный мягкий метод гибридизации позволяет исследовать не только связанную с ДНК вирус-специфическую РНК, но и примыкающие к ней участки, соответствующие, возможно, РНК хозяина. Удастся практически полностью отмыть не связанную РНК еще до обработки РНКазой,

Стабильный и лабильный к РНКазе материал в составе гибридов с полиомной ДНК

Фракция РНК	Взято в опыт, (имп/мин) × 10 ⁻⁶	Метка в гибриде, имп/мин	Метка, удаляемая РНКазой, имп/мин	Отношение меток, лабильных к РНКазе и стабильных к РНКазе
>45 S	7,5	94	308	2,1
30—45 S	15,0	116	110	0,95
20—30 S	9,0	92	21	0,23
<20 S	6,0	80	8	0,1

и, таким образом, РНКазы удаляет одноцепочечные хвосты частично гибридизованных молекул.

В табл. 2 представлены цифры, характеризующие соотношение между «одноцепочечными хвостами» и гибридизованным материалом. Это отношение высоко для РНК зоны >45S и ниже в зоне 30—45S. В областях <30S гибридизуется, вероятно, вся цепь РНК и одноцепочечные негибридизованные хвосты отсутствуют.

Предварительные опыты показали, что если удалить РНК из гибридов нагреванием в воде и провести гибридизацию удаленной РНК с избытком ДНК, выделенной из клеток хомячка, то происходит связывание 1—2% внесенной метки. Этот результат подтверждает присутствие последовательностей РНК хозяина в составе длинных цепей, содержащих вирус-специфическую РНК.

Полученные данные находятся в согласии с вышесказанными представлениями о механизме интеграции вирусного и клеточного генома, хотя их ни в коем случае нельзя рассматривать как доказательство приведенной модели. Следующий шаг на этом пути — изучение локализации отрезков вирус-специфической и хозяйской ДНК-подобной РНК в составе гигантского предшественника.

Сходные результаты были получены при исследовании свойств вирус-специфической РНК в клетках, трансформированных вирусом SV-40 (8—10). Существование гигантской РНК, содержащей вирус-специфические последовательности, было также недавно обнаружено при продуктивной инфекции вирусом полиомы (11).

Авторы приносят глубокую признательность К. Шерреру и Р. Вейлю (Институт раковых исследований в Лозанне, Швейцария) за предоставление Г. П. Георгиеву возможности для выполнения части настоящей работы.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР

Поступило
28 I 1972

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 H. Westphal, R. Dulbecco, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **59**, 1158 (1968).
- 2 J. Sambrook, N. Westphal et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **60**, 1288 (1968).
- 3 G. P. Georgiev, J. Theoret. Biol., **25**, 473 (1969).
- 4 I. S. Irlin, Virology, **32**, 725 (1967).
- 5 K. Scherrer, J. E. Darnell, Biochem. Biophys. Res. Commun., **7**, 486 (1962).
- 6 Ph. Kourilsky, S. Manteuil et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., **41**, 1080 (1970).
- 7 K. Oda, R. Dulbecco, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **60**, 525 (1968).
- 8 S. Tonegawa, G. Walter et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **35**, 823 (1970).
- 9 U. Lindberg, J. E. Darnell, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **65**, 1089 (1970).
- 10 R. Wall, J. E. Darnell, Nature New Biol., **232**, 73 (1971).
- 11 N. H. Acheson, E. Buetti et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **68**, 2231 (1971).