

УДК 576.858

БИОХИМИЯ

О. В. ЗАЙЦЕВА, Л. К. МЕНЬШИХ, О. И. КИСЕЛЕВ, В. С. ГАЙЦХОКИ,
Ф. И. ЕРШОВ, Л. В. УРЫВАЕВ, академик АМН СССР В. М. ЖДАНОВ,
член-корреспондент АН СССР С. А. НЕЙФАХ

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУКТОВ ВИРУССПЕЦИФИЧЕСКИХ СИНТЕЗОВ В ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЯХ

В предыдущих работах было показано, что выделенная из вирионов вируса венесуэльского энцефаломиеелита лошадей (ВЭЛ) инфекционная РНК проникает в изолированные митохондрии печени крысы и митохондрии куриных эмбрионов и индуцирует в них синтез вирусспецифических РНК, которые аналогичны вирусным РНК, обнаруженным в индуцированных клетках (^{1, 2}). Продукты вирусспецифических синтезов в митохондриях были предварительно идентифицированы как рибонуклеопротеиды, обладающие инфекционной активностью.

Настоящее сообщение посвящено анализу природы конечных продуктов, образующихся в реконструированной системе: изолированные митохондрии + + инфекционная РНК вируса. При этом в качестве ориентиров были использованы изученные ранее физико-химические параметры вируса ВЭЛ и его компонентов (^{3, 4}). Так, коэффициенты седиментации для зрелых вирионов, для их РНП и для гибридных комплексов вирионной РНК с клеточными белками («псевдовирусов») соответственно 360 S, 140 S и 60–80 S, а их плавучая плотность в CsCl соответственно 1,24 г/см³, 1,41 и 1,31–1,38 г/см³.

Митохондрии выделяли из гомогенатов печени крысы и куриных эмбрионов и инкубировали с инфекционной РНК вируса ВЭЛ в присутствии смеси C¹⁴-аминокислот. Условия инкубации и состав инкубационных сред описаны ранее (¹). После инкубации митохондрии осаждали центрифугированием при 12 000 g, а полученную надосадочную жидкость использовали для анализа седиментационных и плотностных свойств новообразованных РНП.

В первой серии опытов было установлено, что продукт вирусспецифических синтезов можно обнаружить в среде в процессе инкубации митохондрий, причем максимальное содержание новообразованного продукта достигается к 60–80 мин. инкубации. На рис. 1 представлено распределение радиоактивности (метка C¹⁴-аминокислоты) в 15–40% градиенте концентрации сахарозы (ротатор SW 25,2 центрифуги Спинко L-2, режим:

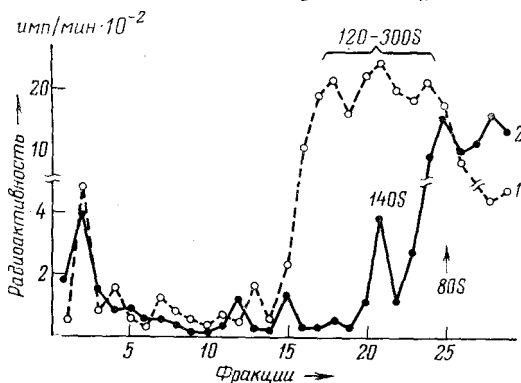


Рис. 1. Седиментационный профиль продукта вирусспецифических синтезов в митохондриях (в надосадочной жидкости). 1 — в присутствии MgCl₂, 2 — после обработки ЭДТА (0,05 M)

23 000 об/мин. в течение 2 час.). Как видно из рисунка (кривая 1), в присутствии $MgCl_2$ вновь синтезированный материал выявляется в гетерогенной зоне 120–300 S. Кроме того, в постмитохондриальном супернатанте обнаруживаются и более тяжелые радиоактивные компоненты, которые при градиентном центрифугировании седиментируются на дно пробирок.

Обнаруженная гетерогенность седиментационного распределения радиоактивного материала является, по-видимому, следствием выхода в супернатант различных типов структур. С одной стороны, эти структуры могут быть представлены различными типами вирусспецифических РНП,

с другой — полирибосомами и фрагментами митохондриальных мембран.

Для анализа природы этих радиоактивных компонентов была использована обработка постмитохондриального супернатанта ЭДТА (50 мМ), вызывающая диссоциацию полирибосом.

Как следует из рис. 1 (кривая 2), после обработки супернатанта ЭДТА имеет место значительное снижение радиоактивности в гетерогенной области 120–300 S с выявлением гомогенного ЭДТА-резистентного пика с коэффициентом седиментации 140 S. Полученный результат свидетельствует о том, что гетерогенная радиоактивная область представлена, по-видимому, в значительной степени полирибосомами, диссоциация которых

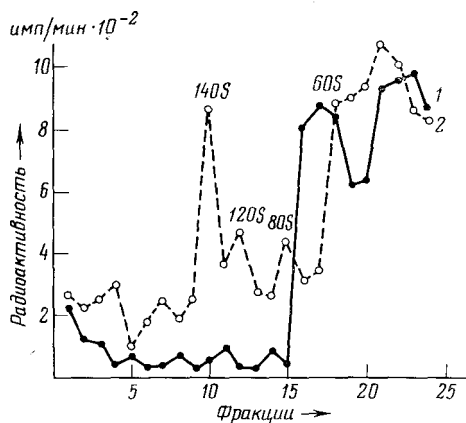


Рис. 2. Распределение радиоактивности, связанной с РНП-структурами после предварительной обработки продукта ЭДТА и детергентами. 1 — контроль, незаряженные митохондрии, 2 — митохондрии, инфицированные вирусом РНК (50 мкг/мл)

при обработке ЭДТА позволяет выявить структуры, совпадающие с параметрами истинных вирионных РНП.

В последующих опытах было обнаружено, что обработка супернатанта комбинацией ЭДТА (0,05 M), дезоксихолата (0,5%) и Brij (0,5%) (10 мин. при комнатной температуре с последующим осветлением при 12 000 g) позволила выявить в градиенте концентрации сахарозы 7–30% (режим прежний) различные типы РНП-структур с константами седиментации 80, 120 и 140 S (рис. 2, 2).

В контрольных опытах с неинфицированными митохондриями (кривая 1) градиентный анализ супернатанта, обработанного детергентами и ЭДТА, не позволяет выявить описанные выше рибонуклеопротеиды, что служит дополнительным доказательством их вирусспецифической природы.

По аналогии с изученными ранее истинными вирионными РНП и гибридными типами рибонуклеопротеидов вируса ВЭЛ можно предположить, что и в случае репликации вируса в изолированных митохондриях новообразованная инфекционная РНК входит в состав различных РНП-комплексов. Действительно, как оказалось, меченая РНК, изолированная из РНП-комплексов постмитохондриального супернатанта, соответствует вирионной (40S) и репликативной (20S) форме РНК этого вируса.

Гетерогенность новообразованных вирусспецифических РНП выявляется также и при определении их плавучей плотности в градиенте $CsCl$ (ρ 1,50–1,20) (режим: 43 000 об/мин. в течение 14 час., MSE, ротор 3×5). Исследовали фракции сахарозного градиента, соответствующие 60–160 S, предварительно их дигализовали. Данные одного из таких опытов представлены на рис. 3. Как следует из представленных результатов, в супернатанте после инкубации «незараженных» митохондрий обнару-

живается пик радиоактивности с плавучей плотностью $1,34 \text{ г/см}^3$. Супернатант из митохондрий, инкубированных с вирусной РНК, содержит дополнительные радиоактивные компоненты с плавучими плотностями 1, 3; 1,36 и $1,40 \text{ г/см}^3$. Последние могут рассматриваться как гибридные и истинные вирусспецифические РНП-комплексы, для окончательного выяснения природы которых требуются дополнительные исследования. Следует отметить, что на рис. 2 и 3 представлены результаты разных опытов, чем, возможно, объясняется некоторое несоответствие в распределении радиоактивности в обоих градиентах.

Таким образом, приведенные данные показывают, что продукты вирусспецифических синтезов в изолированных митохондриях представлены различными типами рибонуклеопротеидов, различающимися по седиментационным и плотностным свойствам. Преобладающими в количественном отношении структурами являются гетерогенные гибридные РНП-комплексы, что, возможно, служит отражением несбалансированных синтезов вирусспецифических РНК и белков в митохондриях.

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

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

Поступило
23 X 1972

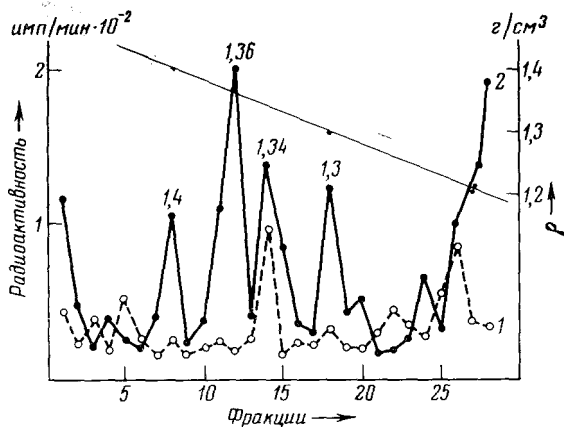


Рис. 3. Распределение радиоактивности в градиенте плотности CsCl. 1, 2 — обозначения те же, что и на рис. 2

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. С. Гайцхоки, Ф. И. Ершов и др., *Вопр. вирусол.*, № 3, 269 (1971).
- ² Ф. И. Ершов, В. С. Гайцхоки и др., *Вопр. вирусол.*, № 3, 274 (1971).
- ³ Л. В. Урываев, В. М. Жданов и др., *Вопр. вирусол.*, № 3, 330 (1970).
- ⁴ L. V. Uryvaev, V. M. Zhdanov, F. I. Yershow, *Arch. ges. Virusforsch.*, **33**, 281 (1971).