

А. П. ПЕРЕВОЗЧИКОВ, О. К. КУЗНЕЦОВ, Ю. П. ЗЕРОВ,
Г. Ф. ПЛУЖНИКОВА, И. Ф. СЕЙЦ

РНК-ЗАВИСИМАЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗА В ВИРИОНАХ ВИРУСА САРКОМЫ РАУСА

(Представлено академиком Е. М. Крепом 30 X 1972)

В вирионах многих сложных вирусов (гриппа, везикулярного стоматита и др.), содержащих одноцепочечную РНК, обнаружена РНК-зависимая РНК-полимераза (¹, ⁵, ⁷) — фермент, обеспечивающий репликацию РНК вируса. РНК-содержащие онкогенные вирусы представляют собой группу, родственную по многим признакам вышеупомянутым вирусам. Открытая Темным и Мизутани (¹¹), а также Бэлтимором (⁴) в вирионах РНК-содержащих онкогенных вирусов обратная транскриптаза способна обеспечить интеграцию генома онкогенного вируса и генома клетки, что влечет за собой трансформацию клеток. Однако вызывает некоторое сомнение способность этого фермента и связанного с ним ферментного комплекса (ДНК — ДНК-полимераза, лигаза и др.) обеспечить репликацию вирусной нуклеиновой кислоты (⁸). Это обстоятельство побудило нас предпринять новую попытку найти в вирионах вируса саркомы Рауса РНК-зависимую РНК-полимеразную активность, несмотря на неудачи предыдущих исследователей (⁴, ¹¹).

В настоящей работе приводятся данные, свидетельствующие о существовании в вирионах вирусов саркомы Рауса (ВСП К-3) и лимфоидного лейкоза птиц (РАВ-1) РНК-полимеразной активности. Вирусы были накоплены в культуре куриных фибробластов, сконцентрированы и очищены (², ³). Степень чистоты вируса проверялась под электронным микроскопом и с помощью электрофореза РНК вируса в 2,5% полиакриламидном геле. Вирионы разрушали неионным детергентом тритоном X-100 (0,5–1,0%) в течение 10 мин. при комнатной температуре в присутствии β-меркаптоэтанола (0,01%). В отличие от описанных ранее методик (⁴, ¹¹), по-

Таблица 1

Особенности РНК-синтезирующей активности вируса саркомы Рауса и продукта реакции

Объект исследования	Условия реакции	Включение Н ³ -УТФ, %
Разрушенные вирусные частицы	Полная система (ПС)	100
	ПС—АТФ, ГТФ, ЦТФ	4
	ПС + 40 мкг/мл ДНКазы	120
	ПС + 17 мкг/мл актиномицина D	85
	ПС + 200 мкг/мл РНКазы	55
Продукт реакции *	ПС + 30 мкг/мл РНКазы	50
	Без обработки	100
	Обработано	
	50 мкг/мл РНКазы	52
	25 мкг/мл ДНКазы	105

* По окончании реакции производили экстракцию нуклеиновой кислоты в системе: фенол — 0,5% додецилсульфат Na; РНК осаждали из водной фазы 2 объемами спирта — 0,2 моля ацетата.

лученные гомогенаты подвергались диализу против фосфатно-солевого буфера, чтобы освободиться от детергента.

Реакционная смесь содержала в 0,5 мл 40 $\mu\text{мол}$ трис- HCl -буфера (рН 7,8), 2 $\mu\text{моль}$ MgCl_2 , 1,8 $\mu\text{моль}$ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, по 0,1 $\mu\text{моль}$ АТФ, ГТФ, ЦТФ и 0,5 $\mu\text{моль}$ УТФ, очищенных дополнительно на Дауэкс-1, 0,01% β -меркаптоэтанола, 1–2 $\mu\text{СН}^3$ -УТФ (15 С / ммоль) («Amersham») и 0,1 мл вирусного белка (около 10^8 фокусобразующих единиц вируса в 1 мл). Время инкубации 1 час, температура 37°. Реакцию останавливали добавлением равного объема 10% ТХУ кислоты.

При добавлении гомогената вируса (0,5–1,0 мг белка) в систему для обнаружения РНК-полимеразной активности наблюдалось включение метки в ТХУ-нерастворимую фракцию, которую собирали и промывали на нитроцеллюлозных фильтрах. Радиоактивность определялась в толуольном сцинтиллаторе в счетчике Марк-2 («Nuclear Chicago»).

В табл. 1 приводятся данные, характеризующие особенности РНК-синтезирующей активности и продукта реакции.

Как видно из табл. 1, включение метки в системе тормозится исключением трех НТФ и РНКазой и практически не зависит от ДНКазы и актиномицина D. Продуктом реакции является РНК. Исследование в параллельных опытах вируса лимфоидного лейкоза птиц (РАВ-1), сходного по струк-

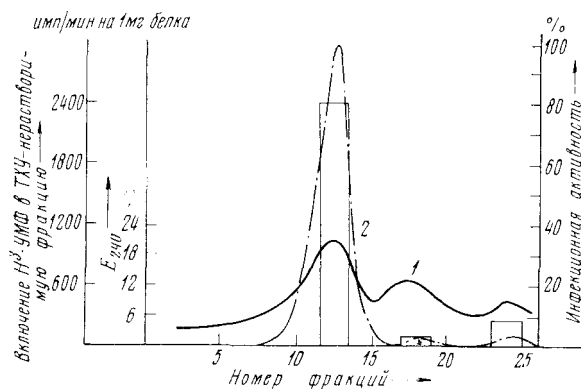


Рис. 1. Коседиментация полимеразной активности с частицами вируса саркомы Рауса. 1 — абсорбционный профиль элюции градиента сахарозы (15–60%); 2 — кривая инфекционной активности вируса. Величина столбиков представляет собой включение метки из H^3 -УТФ в имп/мин на 1 мг белка

туре с вирусом Рауса, также выявило наличие подобной полимеразной активности. РНК-полимеразная активность гомогенатов ВСП полностью инактивировалась при замораживании и оттаивании, тогда как в препаратах интактного вируса она выдерживала неоднократное замораживание (в ходе очистки вируса).

Полимеразная активность препаратов ВСП практически полностью коседиментирует при ультрацентрифугировании в градиенте сахарозы (15–60%) с фракцией, имеющей максимум инфекционной активности (95%) и содержащей, по данным электронной микроскопии, целые вирионы (рис. 1). Описанные данные позволили сделать заключение о связи исследуемой ферментативной активности с вирусными частицами.

Зависимость активности фермента от концентрации ионов Mg^{2+} представляет обычную кривую с максимумом при концентрации Mg^{2+} 7–8 ммол/л.

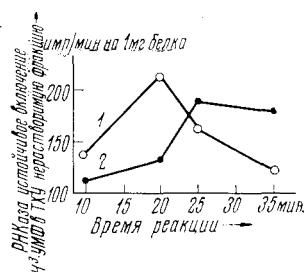
Предварительные данные по отжигу продукта реакции (по методу Бэлтимора и др. (3)) с РНК ВСП и гетерологичной РНК микоплазмы птиц

(*Mus. gallisepticum*) показали, что наибольшей устойчивостью к РНКазе обладает гибридный комплекс РНК вируса — РНК продукта реакции. Это свидетельствует о матричном характере реакции.

При постановке опытов с препаратами вируса, содержащими частично деградированную в результате хранения при 4° РНК, в отличие от вышеприведенных данных, отмечалось повышенное включение Н³-УТФ в кислотонерастворимый продукт в отсутствие остальных нуклеозидтрифосфатов (табл. 2), причем величина включения была пропорциональна времени хранения вируса.

Как видно из табл. 2, включение метки было значительно выше в присутствии лишь одного УТФ, чем в полной системе, содержащей 4 нуклео-

Рис. 2. Кинетика включения Н³-УТФ в препараты вируса, предварительно инкубированные с РНКазой. 1 — кривая включения метки в препараты вируса, предварительно инкубированные с 5 мкг РНКазы; 2 — кривая включения метки в препараты вируса, не подвергавшиеся предварительной обработке РНКазой. РНКазы (5 мкг) добавлялась в реакционную смесь



зидтрифосфата. Величина включения в данном случае достигала максимальной величины при более высокой концентрации Mg^{2+} (16,6 мМ), чем в стандартной системе. Включение еще более стимулировалось при добавлении к реакционной смеси небольших концентраций РНКазы (15 мкг/мл). Это явление можно объяснить синтезом гомополимеров на матрице сравнительно коротких гомополинуклеотидов (возможно, по принципу скользящего синтеза гомополимеров) (6). Существование последовательностей поли-А у онкогенных РНК-содержащих вирусов показано (9, 10), причем сегменты РНК, богатые аденином, обладают повышенной резистентностью

Таблица 2

Включение Н³-УТФ препаратами вируса саркомы Рауса, содержащими частично деградированную матрицу

Условия реакции *	Включение Н ³ -УТФ в имп/миллиграмм на 1 мкг белка при 16,6 мМ Mg^{2+}
АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ	1950
АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ + 15 мкг/мл РНКазы	1000
УТФ	8500
УТФ + 15 мкг/мл РНКазы	9700

* Различия в реакционной смеси обуславливались наличием указанных нуклеозидтрифосфатов.

к действию панкреатической РНКазы (10). Естественно предположить, что такой синтез должен стимулироваться при частичной деградации РНК матрицы и освобождении гомополимерных последовательностей, что и наблюдалось в нашем случае. В связи с вышеприведенными фактами возникла необходимость проверить влияние частичной деградации РНК вируса саркомы Рауса на ее способность служить в качестве матрицы.

На рис. 2 представлены данные по кинетике включения метки препаратами вируса, предварительно инкубированными или неинкубированными с РНКазой. В пробах, где РНКазы добавлялась только в момент начала реакции, включение достигало максимума позднее и спад был более пологий, чем в параллельных пробах, предварительно обработанных РНКазой. Ве-

личина включения метки на ранних стадиях реакции в пробах, предварительно обработанных РНКазой, была заметно выше, чем в необработанных, хотя на более поздних стадиях наблюдалась обратная зависимость.

Результаты опытов по кинетике и по действию РНКазы в полной системе и в системе без нуклеотидтрифосфатов позволяют предположить, что деградировавшая в незначительной степени РНК вируса Рауса служит более эффективной матрицей РНК-зависимого синтеза РНК, чем интактная РНК, как в полной системе, так и в системе с одним УТФ. В то же время при более глубоком гидролизе РНК ее матричные свойства исчезают, так что наблюдаемое уменьшение включения объясняется гидролизом и матрицы, и продукта реакции.

Представленные данные пока не позволяют с полной уверенностью утверждать, что мы имеем дело с ферментом матричного копирования РНК вируса (репликазой). Нельзя исключить альтернативное предположение, что исследуемый фермент является концевой РНК-синтетазой, достраивающей гомополирибонуклеотидные цепи (поли-У) к вирусной РНК, хотя существование подобного фермента трудно объяснить с точки зрения современных представлений о репродукции РНК-содержащих вирусов.

Таким образом, приведенные результаты свидетельствуют о наличии в вирионах ВСР РНК-зависимой РНК-полимеразой активности, свойства которой более подробно изучаются в настоящее время.

Выражаем глубокую благодарность Г. А. Савостьянову за проведение электронно-микроскопических исследований.

Научно-исследовательский институт онкологии
им. Н. Н. Петрова
Ленинград

Поступило
20 X 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. И. Агоп, И. Г. Атабеков и др., Молекулярная биология вирусов, «Наука», 1971. ² О. К. Кузнецов, А. М. Дядькова, Вопр. онкол., 15, 2, 52 (1969). ³ C. Altaner, H. Temin, Virology, 40, 118 (1970). ⁴ D. Baltimore, Nature, 226, 1209 (1970). ⁵ D. Baltimore, A. Huang, M. Stampfer, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 66, 572 (1970). ⁶ M. Chamberlin, P. Berg, ibid., 48, 81 (1962). ⁷ R. Francki, I. Randles, Virology, 47, 270 (1972). ⁸ R. Gallo, Nature, 234, 194, 227 (1972). ⁹ D. Gillespie, S. Marshall, R. Gallo, Nature New Biology, 236, 227 (1972). ¹⁰ M. Lai, P. Duesberg, Nature, 235, 383 (1972). ¹¹ H. Temin, S. Mizutani, Nature, 226, 1211 (1970).