

УДК 591.1.05 : 576.858.9

БИОХИМИЯ

В. С. ГАЙЦХОКИ, В. И. ГОЛУБКОВ, К. Б. ГРАБОВСКАЯ,
О. И. КИСЕЛЕВ, А. А. ТОТОЛЯН, С. А. НЕЙФАХ

**ИНДУКЦИЯ СИНТЕЗА ФАГОВОСПЕЦИФИЧНЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ
В ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЕЧЕНОЧНЫХ МИТОХОНДРИЯХ,
ПРОГРАММИРОВАННОГО РНК БАКТЕРИОФАГА MS2**

(Представлено академиком А. С. Спириным 26 XII 1973)

В настоящее время показан перенос генов вирусов и бактериофагов в клетки высших растений ⁽¹⁾, животных ⁽²⁾ и человека ⁽³⁾, их наследственная стабилизация и выражение в реципиентных клетках. Ряд свойств митохондрий склоняет к мысли, что именно митохондрии вносят значительный вклад в процесс трансплантации чужеродных генов. Об этом свидетельствуют следующие данные: а) черты сходства между генетическими и белоксинтезирующими системами митохондрий и бактерий ^(4, 5); б) относительно малая специфичность митохондрий и их способность к транспорту и трансляции гомологичной ядерной мРНК ^(6, 7) и синтетических полирибонуклеотидов ⁽⁸⁾; в) способность инфекционной РНК вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей ⁽⁹⁻¹¹⁾ и РНК онкорнавируса ⁽¹²⁾ проникать во внутренние мембраны митохондрий, взаимодействовать с митохондриальными белоксинтезирующими структурами и индуцировать синтез полноценных вирусспецифических продуктов.

На основе этих данных было высказано предположение ⁽¹³⁾, что митохондрии могут играть роль адаптера чужеродной генетической информации, введенной в реципиентную клетку в составе геномных нуклеиновых кислот вирусов.

Объектом исследования служили инфекционная РНК фага MS2 и изолированные митохондрии печени крысы. Методические приемы, использованные в работе, описаны в наших сообщениях ^(6, 7, 9-11).

В предварительных опытах была изучена матричная активность РНК фага MS2 в процессах биосинтеза РНК и белка в интактных митохондриях и в полученном из них лизате, обладающем белоксинтезирующей активностью. Оказалось, что при добавлении фаговой РНК к митохондриям наблюдается заметная стимуляция включения C¹⁴-аминокислот в белок и H³-уридина в РНК, которая потенцировалась растворимой фракцией гомогената печени. Актиномицин D в высоких концентрациях существенно подавлял эндогенные матричные синтезы, однако матричная активность фаговой РНК на фоне актиномицина D не только сохранялась, но и возрастала в несколько раз. Эти результаты (табл. 1) позволяют предполагать, что экзогенная РНК фага MS2 при добавлении к митохондриям действительно обладает матричной активностью в процессах трансляции, а индукция актиномицин-резистентного синтеза РНК указывает, по-видимому, на синтез функционально активной РНК-зависимой РНК-репликазы, закодированной в геноме фага.

В опытах на интактных митохондриях индукция фавоспецифичных синтезов существенно лимитируется проникновением добавленной РНК внутрь органоидов, эффективность которого довольно низка. Поэтому было целесообразно исследовать матричную активность фаговой РНК в

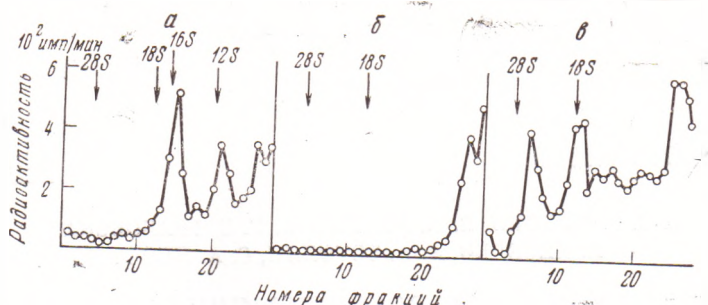


Рис. 1. Синтез фавоспецифичных РНК в изолированных митохондриях печени крысы. а — РНК из контрольных митохондрий; б — РНК из контрольных митохондрий, инкубированных с актиномицином D; в — РНК из митохондрий, инкубированных с фавой РНК и с актиномицином D

опытах на лизате митохондрий, при которых устраняется проблема проницаемости.

Предварительно было показано, что лизат митохондрий, полученный с помощью тритона X-100, способен к эндогенному включению C^{14} -ампнокислот в белок, а после истощения может служить РНК-зависимой системой трансляции. В то же время лизат не содержит ДНК и не обладает активностью синтеза РНК. Как показывает табл. 2, добавление фавовой РНК к лизату индуцирует после 20 мин. скрытого периода синтез РНК.

Таблица 1

Влияние РНК бактериофага MS2 на биосинтез РНК и белка в изолированных митохондриях печени крысы

| № пробы | Добавки | Включение радиоактивных предшественников, имп/мин на 1 мг белка митохондрий | |
|---------|-----------------|---|------------------------|
| | | H^3 -уридин | C^{14} -аминокислоты |
| 1 | — | 4260 | 9700 |
| 2 | РНК | 6300 | 11600 |
| 3 | р.ф. | 4680 | 19205 |
| 4 | р.ф. + РНК | 14212 | 27113 |
| 5 | р.ф. + AD | 2842 | 6322 |
| 6 | р.ф. + AD + РНК | 19890 | 32820 |

Примечание. Р. ф. — растворимая фракция, AD — актиномицин D.

Таблица 2

Синтез РНК в лизате митохондрий печени крысы в присутствии РНК бактериофага MS2

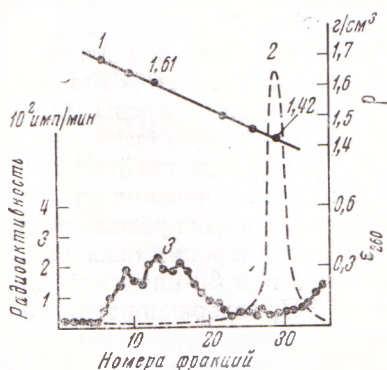
| № пробы | Добавки | Время инкубации, мин. | Включение C^{14} -УТФ, имп/мин на 1 мг белка лизата |
|---------|-----------------------|-----------------------|---|
| 1 | — | 5 | 0 |
| 2 | — | 20 | 0 |
| 3 | РНК фага MS2 (50 мкг) | 5 | 20 |
| 4 | То же | 20 | 926 |
| 5 | Дрожжевая тРНК (1 мг) | 20 | 0 |
| 6 | Ядерная РНК (1 мг) | 20 | 0 |

При этом индуцирующий эффект фавовой РНК оказался специфичным, так как ядерная РНК и тРНК оказались неактивными.

Полученные данные позволяют допустить, что в лизате митохондрий имеет место репликация фавовой РНК и что наблюдавшийся скрытый период соответствует времени, необходимому для синтеза РНК-репликазы на матрице фавовой РНК.

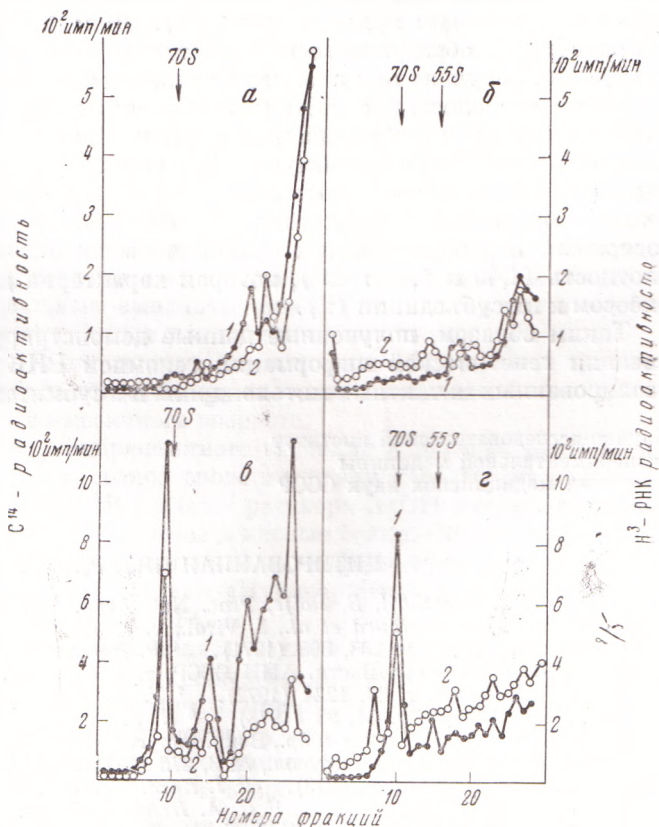
Целью дальнейших опытов была идентификация продуктов фаговоспецифичных синтезов в митохондриях, программированных фаговой РНК. Прежде всего, был проведен седиментационный анализ новообразованной РНК в градиенте концентрации сахарозы. Рис. 1а показывает, что при длительной инкубации митохондрии синтезируют 16S- и 12S-РНК. Синтез

Рис. 2. Анализ РНК, синтезированной в лизате митохондрий в присутствии РНК фага MS2, в самоустанавливающемся градиенте плотности сульфата цезия. 1 — плотность раствора Cs_2SO_4 , 2 — распределение маркерной ДНК из печени крысы, 3 — распределение новообразованной C^{14} -РНК



этих классов РНК угнетается актиномицином D (рис. 1б). Седиментационное распределение РНК, синтезированной митохондриями в присутствии фаговой РНК на фоне актиномицина D (рис. 1в), было совершенно иным. В этих условиях преобладал 27–28S-компонент, соответствующий, по-ви-

Рис. 3. Седиментационный анализ рибонуклеопротеидов митохондрий. а — РНП контрольных митохондрий; б — РНП контрольных митохондрий, инкубированных с 50 мкг/мл актиномицина D; в — РНП митохондрий, инкубированных с РНК фага MS2 (100 мкг/мл); г — РНП митохондрий, инкубированных с актиномицином D и РНК фага MS2. 1 — радиоактивность C^{14} -белка, 2 — радиоактивность H^3 -РНК



димому, вирионной РНК фага MS2, а также обнаруживалась гетерогенная фракция ~18S, описанная в литературе как продукт деградации фаговой РНК в инфицированных клетках (16). Фаговоспецифичная природа этих классов РНК доказывается их отсутствием на контрольных седиментограммах, т. е. в отсутствие фаговой РНК, и резистент-

ностью их синтеза к актиномицину D. Продукт матричной активности фаговой РНК в лизате митохондрий при равновесном центрифугировании в Cs_2SO_4 характеризовался довольно гетерогенным распределением с максимумом радиоактивности в зоне с плотностью $1,610 \text{ г/см}^3$ (рис. 2), что характерно для двухнитевых репликативных форм вирусных РНК (¹⁷). Таким образом, инфекционная РНК фага MS2 индуцирует в митохондриях синтез классов РНК, которые по седиментационным и плотностным характеристикам могут быть идентифицированы как репликативная форма фаговой РНК, вирионная РНК фага MS2 и минорные фаговоспецифичные РНК.

Для выяснения природы рибонуклеопротеидных структур, содержащих новообразованную фаговую РНК, митохондрии инкубировали с РНК фага MS2 в условиях двойной метки H^3 -уридином и C^{14} -аминокислотами. После инкубации митохондрии лизировали тритоном X-100 и исследовали седиментационное распределение новообразованных H^3 -РНК и C^{14} -белков в градиенте концентрации сахарозы. В контрольных опытах (рис. 3а) было показано, что при 60-минутной инкубации в митохондриях отсутствуют тяжелые РНП, содержащие новообразованные РНК и белки. Актиномицин D существенно угнетал синтез РНК и белков в контрольных митохондриях (рис. 3б). В присутствии фаговой РНК преобладающим рибонуклеопротеидным компонентом, содержащим как новообразованную H^3 -РНК, так и вновь синтезированные C^{14} -белки, был 70S-РНП (рис. 3в), который по своим размерам близок к реконструированным комплексам, содержащим фаговую РНК и покровный белок фага (¹⁸). Синтез этого компонента не угнетается актиномицином D, что является еще одним указанием на его фаговоспецифичную природу (рис. 3г). Дополнительная информация о природе РНП, образующегося в митохондриях в присутствии фаговой РНК, была получена при анализе их плавучей плотности в градиенте CsCl . При этом оказалось, что РНП митохондрий, программированных фаговой РНК, содержит новообразованные РНК и белок и распределяется в зоне плавучей плотности с максимумом $1,37 \text{ г/см}^3$. Этот продукт по плотностной характеристике близок к интермедиатам репродукции фага MS2 в чувствительных бактериальных клетках (¹⁹). РНП контрольных митохондрий не содержали новообразованных белков и имели более высокую плавучую плотность ($1,45$ и $1,46 \text{ г/см}^3$), которая характерна для митохондриальных рибосом и их субъединиц (²⁰).

Таким образом, полученные данные демонстрируют возможность реализации генетической информации геномной РНК бактериофага MS2 в изолированных интактных митохондриях и в субмитохондриальной системе.

Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

Поступило
18 XII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. Doy, P. Gresshoff, B. Rolfe, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 723 (1973).
- ² W. Munyon, E. Kreiselburd et al., J. Virol., v. 7, 813 (1971).
- ³ C. Merrill, M. Geier, J. Petricchiani, Nature, v. 233, 398 (1971).
- ⁴ P. Borst, Ann. Rev. Biochem., v. 41, 333 (1972).
- ⁵ С. А. Нейфаз, Вестн. АМН СССР, т. 1, 8 (1973).
- ⁶ О. И. Куселев, В. С. Гайццоки, Биохимия, т. 37, 1224 (1972).
- ⁷ V. S. Gaitskhoki, O. I. Kisselev, S. A. Neifakh, FEBS Letters, v. 31, 93 (1973).
- ⁸ R. F. Swanson, Nature, v. 231, 31 (1971).
- ⁹ В. С. Гайццоки, Ф. И. Ершов и др., Вопр. вирусол., № 3, 269 (1971).
- ¹⁰ Ф. И. Ершов, В. С. Гайццоки и др., Вопр. вирусол., № 3, 273 (1971).
- ¹¹ О. В. Зайцева, Л. К. Меньших и др., ДАН, т. 208, 985 (1973).
- ¹² J. Kara, O. Mach, H. Cerna, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 44, 162 (1971).
- ¹³ С. А. Нейфаз, Журн. Всес. хим. общ. им. Д. И. Менделеева, т. 18, 125, (1973).
- ¹⁴ J. Coote, T. Work, Europ. J. Biochem., v. 23, 564 (1972).
- ¹⁵ N. Avadhani, M. Lynch, D. Buetov, Exp. Cell Res., v. 69, 226 (1971).
- ¹⁶ W. Fiers, Virology, v. 33, 413 (1967).
- ¹⁷ R. Doi, S. Spiegelman, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 49, 353 (1963).
- ¹⁸ T. Hohn, Europ. J. Biochem., v. 8, 552 (1969).
- ¹⁹ G. Rotrman, R. Krueger, J. Virol., v. 6, 269 (1970).
- ²⁰ J. Wengler, J. Wengler, K. Scherrer, Europ. J. Biochem., v. 24, 477 (1972).