

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<sup>(1)</sup>, животных<sup>(2)</sup> и человека<sup>(3)</sup>, 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<sup>(4, 5)</sup>; б) относительно малая специфичность митохондрий и их способность к транспорту и трансляции гомологичной ядерной мРНК<sup>(6, 7)</sup> и синтетических полирибонуклеотидов<sup>(8)</sup>; в) способность инфекционной РНК вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей<sup>(9-11)</sup> и РНК онкорна-вируса<sup>(12)</sup> проникать во внутренние мембранные митохондрии, взаимодействовать с митохондриальными белоксинтезирующими структурами и индуцировать синтез полноценных вирусспецифических продуктов.

На основе этих данных было высказано предположение<sup>(13)</sup>, 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<sup>(6, 7, 9-11)</sup>.

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 С<sup>14</sup>-аминокислот в белок и Н<sup>3</sup>-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 фаговоспецифичных синтезов существенно лимитируется проникновением добавленной РНК внутрь органоидов, эффективность которого довольно низка. Поэтому было целесообразно исследовать матричную активность фаговой РНК в

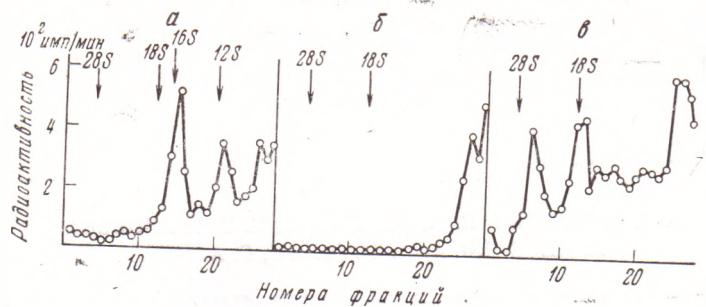


Рис. 1. Синтез фагоспецифичных РНК в изолированных митохондриях печени крысы. *a* — РНК из контрольных митохондрий; *b* — РНК из контрольных митохондрий, инкубированных с актиномицином D; *c* — РНК из митохондрий, инкубированных с фаговой РНК и с актиномицином D

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  $C^{14}$ -аминокислот 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 фаговой 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	2812	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

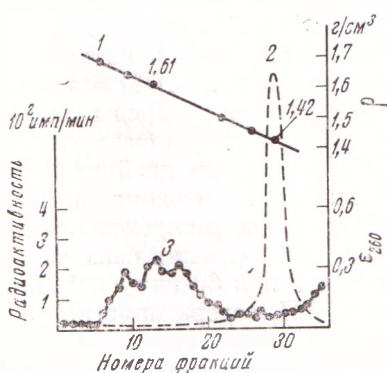
№ пробы	Добавки	Время инкубации, мин.	Включение $C^{14}$ -УТФ имп/мин на 1 мг белка лизата
1	—	5	0
2	—	20	0
3	РНК фага MS2 (50 мкг)	5	20
4	То же	20	926
5	Дрожжевая тРНК (1 мг)	20	0
6	Ядерная РНК (1 мг)	20	0

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

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

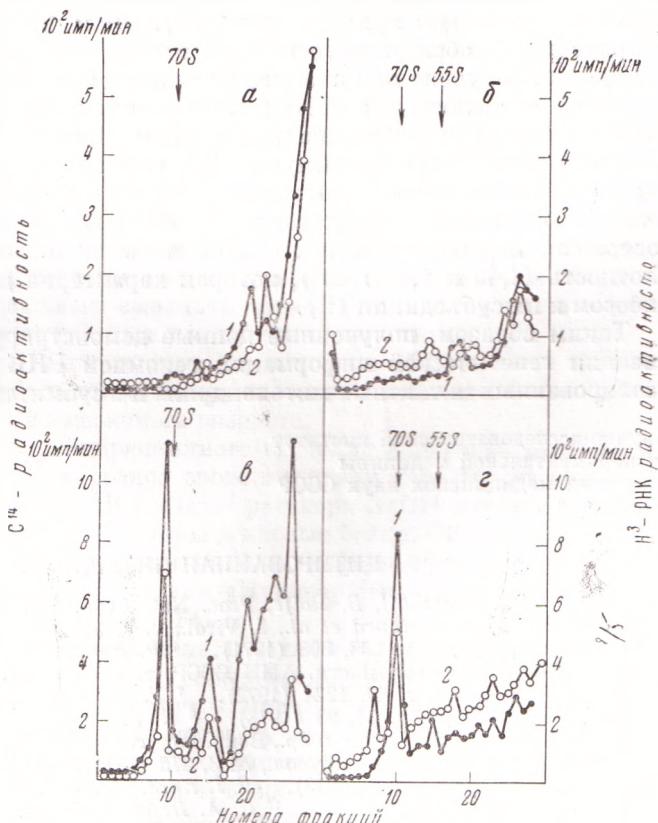
Целью дальнейших опытов была идентификация продуктов фаговоспецифичных синтезов в митохондриях, программированных фаговой РНК. Прежде всего, был проведен седиментационный анализ новообразованной РНК в градиенте концентрации сахарозы. Рис. 1а показывает, что при длительной инкубации митохондрии синтезируют 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  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ , 2 — распределение маркерной ДНК из печени крысы, 3 — распределение новообразованной  $\text{C}^{14}$ -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-види-

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  $\text{C}^{14}$ -белка, 2 — радиоактивность  $\text{H}^3$ -РНК



димому, вирионной РНК фага MS2, а также обнаруживалась гетерогенная фракция  $\sim 18S$ , описанная в литературе как продукт деградации фаговой РНК в инфицированных клетках (<sup>16</sup>). 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  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  характеризовался довольно гетерогенным распределением с максимумом радиоактивности в зоне с плотностью 1,610 г/см<sup>3</sup> (рис. 2), что характерно для двухнитевых репликативных форм вирусных РНК (<sup>17</sup>). 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  $\text{H}^3$ -уридином и  $\text{C}^{14}$ -аминокислотами. После инкубации митохондрии лизировали тритоном X-100 и исследовали седиментационное распределение новообразованных  $\text{H}^3$ -РНК и  $\text{C}^{14}$ -белков в градиенте концентрации сахараозы. 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  $\text{H}^3$ -РНК, так и вновь синтезированные  $\text{C}^{14}$ -белки, был 70S-РНП (рис. 3в), который по своим размерам близок к реконструированным комплексам, содержащим фаговую РНК и покровный белок фага (<sup>18</sup>). 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  $\text{CsCl}$ . При этом оказалось, что РНП митохондрий, программированных фаговой РНК, содержит новообразованные РНК и белок и распределяется в зоне плавучей плотности с максимумом 1,37 г/см<sup>3</sup>. Этот продукт по плотностной характеристике близок к интермедиатам репродукции фага MS2 в чувствительных бактериальных клетках (<sup>19</sup>). РНП контрольных митохондрий не содержали новообразованных белков и имели более высокую плавучую плотность (1,45 и 1,46 г/см<sup>3</sup>), которая характерна для митохондриальных рибосом и их субъединиц (<sup>20</sup>).

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

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