

УДК 547.963.3

БИОХИМИЯ

В. А. ГИНЕВСКАЯ, Ю. В. СВИТКИН, Т. Ю. УГАРОВА, В. И. АГОЛ

**СТАБИЛЬНОСТЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ
ПОЛИ-(А)-СОДЕРЖАЩИХ РНК В КЛЕТКАХ, ЗАРАЖЕННЫХ
ВИРУСОМ ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА**

(Представлено академиком А. С. Спириным 29 VII 1974)

Заражение клеток пикорнавирусами приводит к угнетению синтеза клеточных белков и распаду полисом клетки-хозяина. В то же время, рибосомы зараженных клеток, соединяясь с вирусными РНК, образуют вирусспецифические полисомы и активно синтезируют вирусспецифические белки (¹⁻³). Избирательное нарушение трансляции клеточных матриц могло бы быть обусловлено либо изменением белоксинтезирующего аппарата, выражающимся в предпочтительной трансляции вирусных РНК, либо разрушением или функциональной инактивацией клеточных мРНК.

В предыдущей работе (⁴) для проверки первого предположения мы изучали трансляцию вирусных и клеточных мРНК в бесклеточных экстрактах, полученных из клеток Кребс-II, зараженных вирусом энцефаломиокардита. Избирательного нарушения трансляции клеточных мРНК при вирусной инфекции обнаружено не было. В настоящей работе с целью проверки второго предположения была изучена судьба предсинтезированной мРНК (поли(А)-содержащей РНК цитоплазмы) после заражения клеток Кребс-II вирусом энцефаломиокардита. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии существенного ускорения распада клеточных мРНК при вирусной инфекции; более того, в инфицированных клетках обнаружено несколько большее количество тяжелой РНК, движущейся в полиакриламидном геле медленнее, чем рибосомная 28S РНК.

Изучение судьбы предварительно меченой РНК осложнено тем, что при обычной методике чейза (при разведении меченого предшественника большим избытком немеченого) не удается добиться прекращения включения метки в РНК. Поэтому мы воспользовались методом «холодного» чейза, отличающегося тем, что после добавления в среду немеченых предшественников, клетки выдерживают длительное время при температуре 4° (⁵). При этом, по данным авторов, происходит проникновение и фосфорилирование поступавших в клетку нуклеозидов, но не происходит синтеза и распада РНК; эффективность чейза значительно повышается. Клетки, суспендированные ($2 \cdot 10^7$ кл/мл) в среде Игла, содержащей 0,03% глутамина, метили 1 час при 37° ³H-уридином (5 мкС/мл, 24,5 С/ммоль), разводили охлажденной средой Игла, содержащей 10 мМ немеченого уридина и 5 мМ цитидина, центрифугировали при 800 об/мин 5 мин., и осадок клеток разводили той же средой до концентрации 10^8 кл/мл. Клетки разделяли на две порции, к одной из них добавляли вирус в количестве 20 б.о.е. на 1 клетку, адсорбцию проводили в течение 30 мин. при комнатной температуре. Затем обе порции клеток разводили средой Игла с уридином и цитидином до концентрации $2 \cdot 10^7$ кл/мл и инкубировали 12—14 час. при 4°, а затем 4,5 час. при 37°. Осадок отмытых клеток использовали для получения фракции S_{30} , из которой выделяли РНК методом фенольной депротенинизации при рН 9,0, как описано ранее (⁶). На всех этапах опыта в клетках определяли радиоактивность кислотонераствори-

мого материала. После инкубации клеток при 4° количество метки падает незначительно (примерно на 10%). За 4,5 час. инкубации при 37° количество метки снижается еще на 20–25%. Это подтверждает эффективность использованного приема для прекращения включения метки в РНК. Различий между зараженными и незараженными клетками в содержании кислотонерастворимой метки после инкубации как при 4, так и при 37° не обнаружено. Удельная активность тотальных препаратов РНК из зараженных и незараженных клеток (в имп/мин) · 10⁻³ на единицу оптической плотности при 260 нм) также практически одинакова.

РНК из клеток	зараженных	незаражен- ных
Опыт № 1	21,1	25,5
Опыт № 2	29,6	24,8

Одинаковая удельная активность указывает на то, что в зараженных клетках не происходит усиленного распада клеточных РНК, однако не исключается расщепление РНК на крупные фрагменты. Для проверки этой возможности препараты тотальной РНК фракционировали на колонке с поли(У)-целлюлозой (6) и выделенную поли(А)-содержащую РНК из зараженных и незараженных клеток анализировали в градиентном полиакриламидном геле. Электрофорез проводили по модифицированному методу (7). Градиент концентрации акриламида (2–6,75%) получали с помощью смесителя и одновременно заполняли 16 трубок, длиной 120 мм и внутренним диаметром 4,5 мм. Концентрация N,N'-метилеи-бис-акриламида была постоянной (0,1%). Электрофорез проводили в буфере, содержащем 40 мМ трис-НСl, рН 8,0, 20 мМ ацетат натрия, 2 мМ ЭДТА и 0,1% додецилсульфат натрия. Образец РНК в количестве не превышающем 0,2 мг на трубку наносили в 0,15 мл того же буфера, содержащего 10% сахарозы и бромфенолового синий в качестве «свидетеля». Электрофорез вели при напряжении 90 в в течение 6 час. при комнатной температуре. Гели извлекали из трубок, замораживали в этаноле, охлажденном сухим льдом, разрезали на диски толщиной 1 мм, заливали 0,3 мл смеси 30% Н₂О₂ и 25% NH₄ОН (99:1) и выдерживали 14–16 час. при комнатной температуре, а затем 5 час. при 50° для растворения геля. Раствор переносили во флаконы и радиоактивность определяли в сцинтилляторе (700 мл толуола, 300 мл абсолютного этанола, 4 г РРО и 0,1 РОРОР) на счетчике Mark II фирмы Nuclear – Chicago.

Поли(А)-содержащая РНК из незараженных клеток представляет собой гетерогенный материал, причем 20–40% РНК движется медленнее рибосомной 28S РНК, 40–55% распределяется между 28S и 18S РНК, а 15–20% движется быстрее 18S РНК. Положение 18S и 28S рибосомных РНК определяли в параллельном геле. Характер распределения поли(А)-содержащей РНК из зараженных клеток в целом сходен с характером распределения поли(А)-содержащей РНК из незараженных клеток (данные не представлены). Чтобы иметь возможность уловить тонкие различия в характере распределения этих РНК, постановка опыта была несколько изменена. Клетки сразу разделяли на две порции, одну из них метили ³Н-уридином (10 мкС/мл), как описано выше, а другую ¹⁴С-уридином (520 мС/ммоль, 1 мкС/мл) в тех же условиях. Меченные ³Н-уридином клетки заражали вирусом и затем зараженные и незараженные клетки инкубировали при 4 и 37°, как описано. По окончании инкубации обе порции клеток объединяли и дальнейшие операции проводили обычным способом. После фракционирования тотальной цитоплазматической РНК на колонке с поли(У)-целлюлозой проводили коэлектрофорез меченных по двойной метке поли(А)-содержащих РНК из зараженных и незараженных клеток (рис. 1а).

При сходном в целом характере распределения выявляются некоторые различия: в зараженных клетках несколько меньше материала в зоне

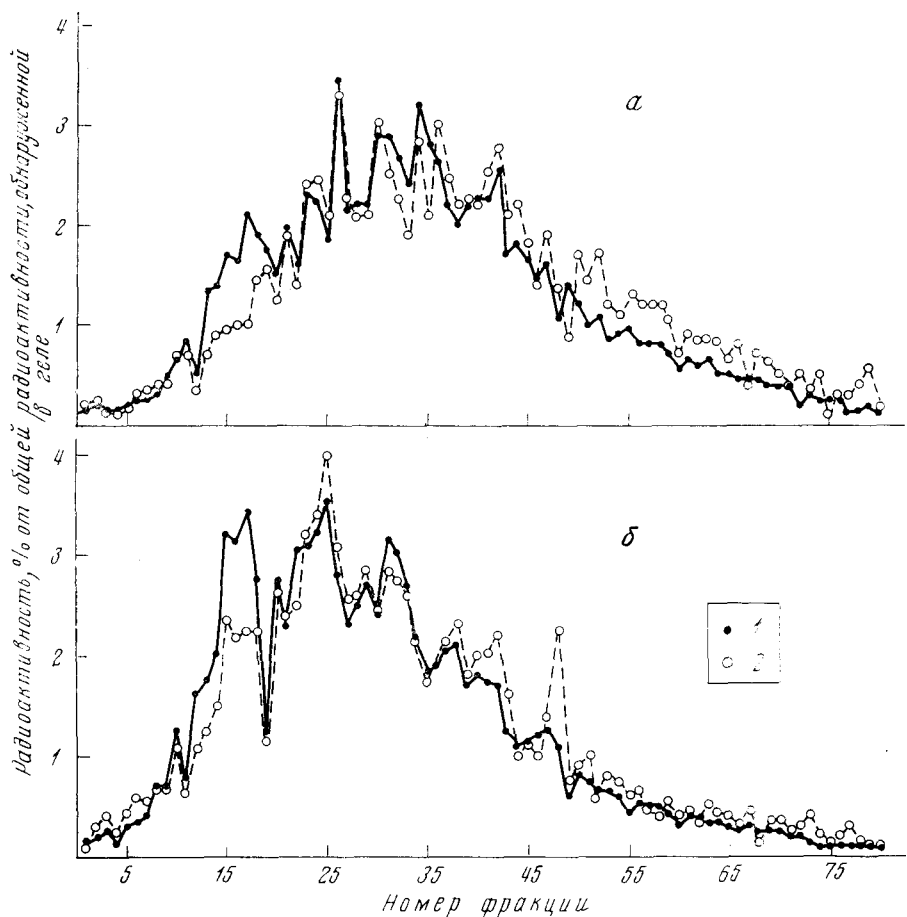


Рис. 1. Электрофореграмма поли (А)-содержащих РНК, выделенных из зараженных (1) и незараженных (2) клеток, инкубированных в отсутствие (а) и присутствии (б) кордицепина

легких РНК, движущихся быстрее 18S РНК, но увеличено количество РНК в пике с подвижностью меньшей, чем у 28S РНК.

Несмотря на использование методики «холодного» чейза, мы не были полностью уверены в прекращении синтеза меченой РНК после добавления немеченных нуклеозидов. В связи с этим были поставлены опыты с кордицепином (3'-дезоксаденозином), который препятствует появлению поли (А)-содержащей РНК в цитоплазме (8). Кордицепин в количестве 25 мкг/мл добавляли к суспензии меченых (зараженных и незараженных) клеток перед началом инкубации при 4°. Было показано, что кордицепин не снимает вирус-индуцируемое угнетение синтеза клеточных белков. Основными продуктами, синтезируемыми в присутствии кордицепина с 4 до 4,5 час. после начала инфекции, так же как и в его отсутствие (рис. 2), являются вирусспецифические полипептиды.

Распределение поли (А)-содержащих РНК из зараженных и незараженных клеток, инкубированных в присутствии кордицепина, показано на рис. 1, б. По сравнению с опытом без кордицепина, различия в зоне быстродвижущихся РНК несколько сглажены, а различия в области тяжелых РНК сохраняются. Природа тяжелого компонента, содержание которого увеличено в зараженных клетках, и его роль в вирус-индуцируемом угнетении синтеза клеточных белков не известна, так же как и природа и функция тяжелых поли (А)-содержащих РНК незараженных клеток.

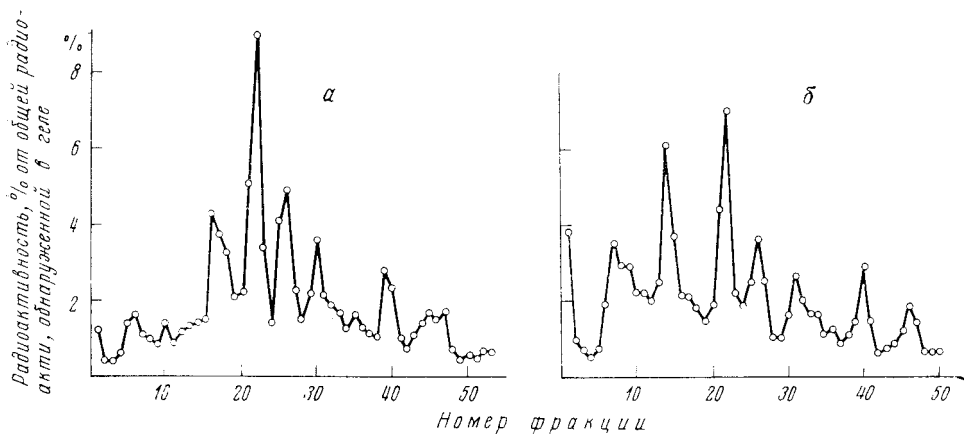


Рис. 2. Электрофореграмма белков, синтезирующихся в зараженных клетках в отсутствие (а) и в присутствии (б) кордицепина

По нашим предварительным данным, эффективность трансляции этих РНК в бесклеточной системе существенно ниже, чем у РНК, мигрирующих быстрее 28S РНК.

Таким образом, на данном этапе исследований нам не удалось выявить при вирусной инфекции ни деградации клеточных мРНК, ни такой модификации белоксинтезирующего аппарата клетки, которая вела бы к избирательному угнетению трансляции клеточных мРНК⁽⁴⁾. Следующая гипотеза, которую кажется целесообразным проверить, — это возможность функциональной инактивации клеточных мРНК. Соответствующие опыты ведутся в нашей лаборатории.

После того, как эксперименты, описанные в настоящем сообщении, были закончены, нам стала известна статья Колби и др.⁽⁹⁾, в которой были получены сходные данные о стабильности клеточных поли-(А)-содержащих РНК в системе вирус менго — клетки *L*.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
4 VII 1974

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Penman, K. Scherrer et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 49, 654 (1966);
² S. Penman, M. Willens, Virology, v. 30, 355 (1966). ³ E. M. Martin, I. M. Kerr, In: Molecular Biology of Viruses, Cambridge, 1968, p. 15. ⁴ Т. Ю. Угарова, Ю. В. Свиткин и др., ДАН, т. 214, 1210 (1974). ⁵ M. Marphy, G. Attardi, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 115 (1973). ⁶ Т. Ю. Угарова, Ю. В. Свиткин и др., ДАН, т. 211, 996 (1973).
⁷ J. E. Caton, G. Goldstein, Anal. Biochem., v. 42, 14 (1971). ⁸ S. Penman, M. Rosbash et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 67, 1878 (1970). ⁹ D. S. Colby, V. Fimerly et al., Virology, v. 43, 858 (1974).