

М. А. ШЛЯНКЕВИЧ, О. Б. ДРИЗЕ, В. С. ШАПОВ
**ОБНАРУЖЕНИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ
В ПРЕПАРАТАХ Т-АНТИГЕНА ВИРУСА SV-40**

(Представлено академиком А. А. Баевым 30 XII 1974)

Ключевым моментом трансформации клеток всеми классами онкогенных вирусов является интеграция клеточного и вирусного геномов. Одним из вероятных механизмов встройки ДНК вирусов группы папова может быть рекомбинация кольцевой молекулы ДНК вируса и линейной ДНК клетки в соответствии с моделью, предложенной для умеренных фагов (¹). Этот процесс предусматривает наличие определенных структур — однонитчатых участков на концах рекомбинирующих молекул, способных взаимодействовать друг с другом по типу «липких концов». Таким образом, начальным этапом интеграции должен быть индуцирующий разрыв молекул ДНК вируса и клетки в определенных точках. Ранее нами было высказано предположение, что этот разрыв осуществляется вирусной сайт-специфической эндонуклеазой (²). По времени образования этот фермент можно отнести к ранним вирусным белкам и отождествить с Т-антигеном. Мы показали, что частично очищенный препарат Т-антигена вируса SV-40 обладает нуклеазной активностью и способен вызывать ограниченное число разрывов ДНК клеток, снижая их молекулярный вес в 4—5 раз (³). В настоящей работе приведены данные, показывающие, что Т-антиген более высокой степени очистки способен индуцировать однонитчатые разрывы ДНК вируса SV-40.

Выделение и очистку Т-антигена вируса SV-40 проводили из опухолей золотистых хомячков, вызванных этим вирусом, по описанной ранее методике под контролем реакции связывания комплемента (³). В части опытов фракции после ДЭАЭ-целлюлозы, содержащие Т-антиген, дополнительно очищали препаративным электрофорезом в полнакриламидном геле. Рабочий объем полый цилиндрической колонки 40 мл, длина 7,5% геля 12 см, сила тока 30 ма, время 4 часа. Одновременно разделяли не более 5 мг белка. В полученных после элюции четырех основных фракциях белка определяли наличие Т-антигена. Т-антиген находился во второй фракции белков от старта. Степень очистки препарата составляла около 400 раз, однако контрольный электрофорез и аналитическое электрофокусирование в геле показали наличие в препаратах 2 или 3 линий белка.

Для получения ДНК вируса SV-40 использовали клетки перевиваемой линии почек зеленых мартышек Vero, выращенных на среде Игла с 10% сыворотки. Клетки заражали во взвеси вирусом с множественностью около 1 б.о.е. на 1 клетку и инкубировали в той же среде, контролируя развитие инфекции методом иммуофлуоресценции на наличие ядерного Т-антигена вируса SV-40. На 6—8 день в культуру вносили ³H-тимидин из расчета 5 мкС на 1 мл (удельная активность препарата 11,8 С/ммоль) и инкубировали еще 1—2 суток. ДНК получали из клеток после их лизиса 0,6% натрий-додецилсульфатом, 0,01 М ЭДТА и 1 М NaCl с последующим осаждением основной массы клеточной ДНК и белка центрифугированием при 17 000 об/мин (⁴). Надсадочная жидкость содержала, помимо вирусной ДНК, значительную примесь клеточной ДНК. Дальнейшую очистку проводили следующим методом. Обработывали проназой (100 мкг/мл) при комнатной температуре в течение 2—4 час., затем добавляли равный объем 8 М мочевины в 0,02 М Na-фосфатном буфере, pH 6,5, а затем пробу помещали в кипящую водяную баню на 8 мин., быстро охлаждали в смеси воды и льда. При этом достигались освобождение ДНК от белка и денатурация линейных фрагментов клеточной ДНК и кольцевых структур с раз-

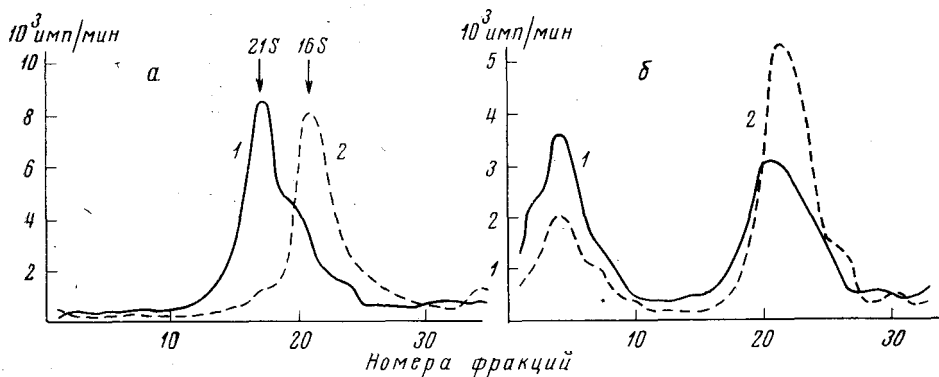


Рис. 1. Седиментация ДНК вируса SV-40 в нейтральном (а) и щелочном (б) градиенте сахарозы. 1 — исходная ДНК; 2 — ДНК, обработанная Т-антигеном вируса SV-40. Стрелками указаны расчетные положения точек 21S и 16S

рывами (форма II ДНК вируса); ковалентно замкнутые формы ДНК вируса (форма I) сохраняли двунитовую структуру. Разделение денатурированной и нативной ДНК проводили на гидроксиллапатите ступенчатой элюцией Na-фосфатным буфером, pH 6,5, 0,175 M (однонитчатые ДНК, РНК, белок) и 0,35 M (двунитчатая ДНК). ДНК диализовали против 0,01 M трис-HCl, pH 7,5, 0,15 NaCl. Полученные препараты содержали ~20 мкг ДНК в 1 мл с уд. активностью 15 000—25 000 имп/мин·мкг.

Изучение нуклеазной активности проводили по следующей методике. Пробы ДНК и Т-антигена брали в опыт в разных соотношениях, обычно 1—2 мкг ДНК и 20—50 мкг белка, 1 mM MgCl₂ в общем объеме 0,2 мл. Инкубирование при 37° от 15 мин. до 2 час. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до 0,1 M и помещением проб в лед. Перед центрифугированием белок удаляли смесью хлороформа с изоамиловым спиртом (24 : 1). Седиментацию ДНК изучали при центрифугировании в нейтральном и щелочном градиентах 5—20% сахарозы; центрифуга «Spinco» L2-50, ротор SW 50, 44 000 об/мин, 3 часа при 20°. Градиент объемом 4,8 мл раскапывали по 2 капли на бумажные фильтры, ДНК преципитировали и отмывали 5% ТХУ. Счет радиоактивности проводили в жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Nuclear—Chicago». Коэффициент седиментации рассчитывали по формуле (5).

При действии препарата Т-антигена на ДНК вируса SV-40 отмечено следующее. На рис. 1а видно, что в нейтральном градиенте сахарозы коэффициент седиментации вирусной ДНК изменяется с 21 S до 16 S, что соответствует ее переходу из формы I в форму II (кольцевая молекула без надспиральных завитков). Этот эффект наблюдался уже при инкубации в пределах 15 мин. При более продолжительном воздействии (до 2 час.) характер седиментации не изменялся.

Наблюдаемое явление может быть следствием либо индукции по крайней мере одного однонитчатого разрыва кольцевой молекулы ДНК, либо результатом воздействия фермента, аналогичного ω-белку (6), обнаруженного в нормальных клетках и способного спимать надспиральные завитки ДНК вируса полиомы, оставляя при этом ДНК ковалентно замкнутыми (7). При исследовании обработанных Т-антигеном проб ДНК в щелочном градиенте сахарозы (рис. 1б) показано, что полученный эффект вероятнее всего обусловлен разрывом одной или обеих нитей ДНК с сохранением кольцевой структуры молекулы. Пик 53 S, образуемый формой I, устойчивой к щелочной денатурации, после обработки Т-антигеном снижался в большей или меньшей степени, тогда как пик 16—18 S (однонитчатые ДНК, образовавшиеся при денатурации формы II) возрастал.

При прогревании препарата Т-антигена при 56° в течение 20 мин. он терял свою активность, что совпадает с известными данными о термола-

бильности Т-антигена вируса SV-40⁽⁸⁾. Твин-40 (0,5%) и β-меркаптоэтанол (1 мМ) не влияли на активность Т-антигена, натрий-додецилсульфат (1%) ее полностью ингибировал.

Характер разрывов, вызываемых Т-антигеном, пока не установлен. Мы не наблюдали образования низкомолекулярных фрагментов ДНК под действием препарата Т-антигена. При увеличении времени инкубации почти в 10 раз не было отмечено изменения характера седиментации ДНК; при обработке вирусной ДНК панкреатической ДНКазой основной пик активности метки закономерно смещался в сторону более легких фракций при удлинении инкубации. Это наблюдение говорит о том, что Т-антиген вызывает ограниченное число разрывов ДНК вируса, возможно, один или два однонитчатых разрыва. В пользу этого говорит и относительная гомогенность и стабильность пика 16–18 S при седиментации в щелочном градиенте сахарозы. Ранее нами⁽³⁾ показано, что при действии Т-антигена на клеточную ДНК также образуются относительно крупные фрагменты (около 3–4·10⁶ дальтон). Все изложенное дает основание охарактеризовать препарат Т-антигена как эндонуклеазу, специфичную в отношении лишь ограниченного числа точек молекул вируса и клетки.

Вопрос о связи наблюдаемой нами нуклеазной активности с «ранними» белками вируса еще не решен окончательно. Полученный нами препарат Т-антигена содержал примесь клеточных белков. Однако использованная в качестве контроля аналогичным образом приготовленная фракция из нормальных тканей хомячка не обладала нуклеазной активностью. Для решения вопроса о специфичности нуклеазной активности необходима дальнейшая очистка препарата.

Анализ температурочувствительных мутантов вируса полиомы и SV-40 показывает, что продукт ts-A гена («ранние» белки) необходим по крайней мере для двух процессов: инициации синтеза вирусной ДНК и интеграции вирусной и клеточной ДНК^(9, 10). Ранее мы отмечали, что в основе этих процессов может лежать общее явление — индукция однонитчатых разрывов ДНК⁽²⁾. Недавно по аналогии с сайт-специфической эндонуклеазой — инициатором синтеза ДНК фага φX174 — подобное предположение было высказано и о папшавирусах⁽¹¹⁾. Показана способность Т-антигена вируса SV-40 взаимодействовать именно с двунитчатой ДНК⁽¹²⁾.

Таким образом, факт обнаружения нами эндонуклеазной активности препарата Т-антигена согласуется с существующими представлениями и имеющимися экспериментальными данными. Можно предположить, что Т-антиген индуцирует синтез вирусной ДНК, вызывая однонитчатые разрывы в определенной точке молекулы. Побочным эффектом его действия будут разрывы ДНК клетки, что приведет к встройке вирусной ДНК в определенные участки клеточного генома. Распространяя механизм инициации синтеза вирусной ДНК на клеточную, допустимо высказать соображение о том, что Т-антиген может одновременно запустить и синтез ДНК клетки, что должно повлечь за собой дальнейшие превращения, характеризующие состояние трансформации.

Институт экспериментальной и клинической онкологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
20 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. M. Campbell, Adv. Genetics, v. 11, 101 (1962). ² М. А. Шляпкевич, Усп. совр. биол., т. 73, 2, 192 (1972). ³ М. А. Шляпкевич, Д. С. Пирцхалаишвили и др., Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 79, № 1, 47 (1975). ⁴ B. Hirt, J. Mol. Biol., v. 26, 2, 365 (1967). ⁵ E. Burgi, A. D. Hershey, Biophys. J., v. 3, 309 (1963). ⁶ J. C. Wang, J. Mol. Biol., v. 55, 523 (1971). ⁷ J. J. Champoux, R. Dulbecco, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 143 (1972). ⁸ R. V. Gulden, R. I. Carp et al., *ibid.*, v. 53, 684 (1965). ⁹ W. Eckhart, Virology, v. 38, 120 (1969). ¹⁰ P. Tegtmeyer, J. Virology, v. 10, 591 (1972). ¹¹ T. J. Henry, R. Knippers, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 71, 1549 (1974). ¹² R. B. Carroll, L. Hager, R. Dulbecco, *ibid.*, v. 71, 3754 (1974).