

УДК 576.858

ВИРУСОЛОГИЯ

В. С. ГАЙЦХОКИ, Ф. И. ЕРШОВ, О. И. КИСЕЛЕВ,
Л. К. МЕНЬШИХ, О. В. ЗАЙЦЕВА, Л. В. УРЫВАЕВ,
действительный член АМН СССР В. М. ЖДАНОВ, С. А. НЕЙФАХ

РЕКОНСТРУИРОВАНИЕ АВТОНОМНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ ИЗ ВИРУСНОЙ РНК И ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ

Митохондрии одноклеточных и многоклеточных организмов обладают особой генетической и белоксинтезирующей системой (¹⁻⁵, ¹³), сходной по многим свойствам с таковой системой у микроорганизмов (⁶). Недавно было показано, что митохондриально-микросомальная фракция фибробластов куриных эмбрионов, которые были инфицированы вирусом, осуществляет вирусспецифические синтезы РНК и белка (⁷, ⁸). В этой фракции выявлен репликативный комплекс и РНК-полимеразная активность данного вируса (⁹). Конечным продуктом синтеза были рибонуклеопротеидные комплексы, обладающие инфекционной активностью (¹⁰, ¹¹).

Нашей задачей было реконструировать автономную генетическую и белоксинтезирующую систему из вирусной РНК и изолированных митохондрий. В случае успешного осуществления этого мы рассчитывали получить модель транскрипции и трансляции митохондрий, которая, с одной стороны, сохраняла бы интактную структуру митохондрий, а с другой стороны, осуществляла синтезы на заведомо известной специфической матрице. Кроме того, на такой модели можно было бы установить конкретный вклад митохондрий в образование специфического инфекционного продукта, который формируется при инкубации митохондриально-микросомальной фракции, полученной из инфицированных вирусом клеток (⁸).

Изолированные митохондрии печени крысы (55 мг белка) находились в контакте с Н³-РНК (28 520 имп/мин в течение 30 мин. при 0°), выделенной из очищенного вируса венесуэльского энцефаломиеелита лошадей (вируса в.э.л.) по методу (¹²). После этого митохондрии инкубировали в среде, оптимальной для дыхания, окислительного фосфорилирования и биосинтеза белка и РНК (¹³) в присутствии печеночного клеточного сока (70 мг белка). По окончании инкубирования митохондрии отмывали от непроникшей изотопной метки и разделяли на субфракции дигитониновым методом (¹⁴). Из субфракции внутренних мембран + матрикс после лизиса 2,5% дезоксихолатом выделяли субфракцию рибосом. Пробы обрабатывали холодной 10% ТХУ, осаждали на миллипоровых фильтрах, промывали ТХУ и спиртом. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике «Паккард — Трикарб». Исследование распределения радиоактивности показало (табл. 1), что около 72% внесенной в пробу изотопной метки обнаруживается в митохондриях. Проникновению радиоактивности в митохондрии способствует добавление в среду печеночного клеточного сока. Проникающая Н³-РНК в основном накапливается в субфракции внутренних мембран + матрикс (64% радиоактивности), в которой находятся митохондриальные рибосомы (59% радиоактивности) и другие компоненты белоксинтезирующей системы. В остальных субфракциях митохондрий определяются только следы радиоактивности. Эти данные свидетельству-

ют об истинном проникновении вирусной РНК во внутреннее пространство митохондрий и о связывании ее с митохондриальными рибосомами и позволяют исключить возможность неспецифической сорбции РНК на поверхности митохондрий или связывания РНК с примесями элементов микросом в препаратах митохондрий.

Дальнейшие опыты были посвящены исследованию влияния нерадиоактивной РНК вируса в.э.л. (3 μ г), проникшей в митохондрии (2—5 мг

Т а б л и ц а 1

Проникновение вирусной H^3 -РНК в митохондрии печени крыс и распределение ее в субфракциях митохондрий

Фракции	Радиоактивность проникшей H^3 -РНК	
	имп/мин на фракцию	%
Интактные митохондрии	20 628	100
Наружные мембраны	222	1,0
Обрывки внутренних мембран	51	0,3
Материал межмембранного пространства	57	0,3
Внутренние мембраны + матрикс	13 338	64
Рибосомы	12 340	59

белка), на включение C^{14} -уридина (0,5 μ С/мл) в РНК и на включение C^{14} -аминокислот (гидролизат белка хлореллы 0,5 μ С/мл) в белки митохондрий. Как показали опыты (табл. 2), вирусная РНК вызывает торможение биосинтеза РНК митохондрий. Этот эффект значительно усиливается при добавлении в среду клеточного сока (10—20 мг белка). В присут-

Т а б л и ц а 2

Влияние вирусной РНК на включение митохондриями радиоактивных предшественников в РНК и в белок

Предшественники	№№ опытов	Добавки	РНК	Интенсивность включения		Эффект РНК, %
				имп/мин на пробу	%	
Включение C^{14} -уридина	1	—	—	856	100	
		—	+	738	86	—14
	2	Клеточный сок	—	2300	100	
		Клеточный сок	+	1260	45	—55
	3	Клеточный сок + актиномицин D	—	172	100	
Включение C^{14} -аминокислот		Клеточный сок + актиномицин D	+	169	98	—2
	1	—	—	2140	100	
		—	+	2300	107	+7
	2	Клеточный сок	—	1200	100	
		Клеточный сок	+	1120	93	—7
	3	Клеточный сок + актиномицин D	—	650	100	
		Клеточный сок + актиномицин D	+	1097	169	+69

ствии актиномицина D (50 μ г/мл), подавляющего синтез РНК митохондрий, вирусная РНК не оказывает влияния на включение C^{14} -уридина в РНК. В опытах по исследованию биосинтеза белка стимулирующее влияние вирусной РНК отчетливо проявляется только при воздействии актиномицином D. В отсутствие же актиномицина вирусная РНК почти не влияет на синтез белка ни сама по себе, ни при добавлении клеточного

сока. Возможно, что под действием актиномицина происходит освобождение митохондриальных рибосом от нестабильных матриц митохондриального происхождения и вследствие этого наступает переключение белоксинтезирующего аппарата митохондрий с синтеза собственных белков на вирусспецифические синтезы на экзогенных матрицах за счет энергии, генерируемой митохондриями.

Теоретически вирусспецифические синтезы должны начинаться с биосинтеза вирусспецифической РНК-полимеразы на матрице внедрившейся в митохондрии вирионной РНК и с репликации РНК. Для исследования

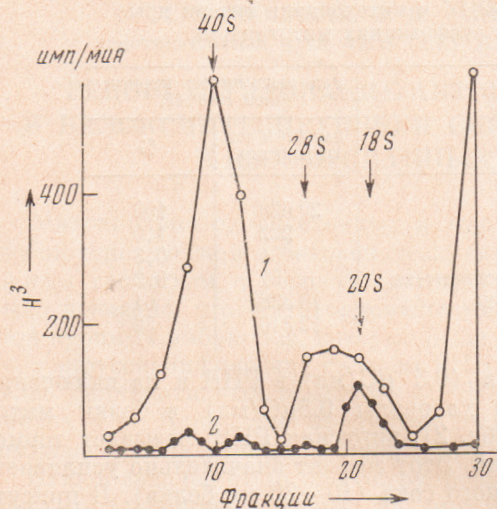


Рис. 1. Седиментационный профиль РНК, выделенной из митохондрий после внедрения в них инфекционной H^3 -РНК вируса в.э.л. Аликвоты каждой фракции обрабатывали РНКазой (Worthington) 10 μ г/мл, 15 мин. 1 — до обработки РНКазой, 2 — после обработки РНКазой

этих синтезов были поставлены опыты с H^3 -РНК, выделенной из вируса в.э.л. и характеризующейся константой седиментации 40 S. Митохондрии после предварительного контакта с вирионной РНК инкубировали в условиях активного дыхания в оптимальной среде (¹³), затем отделяли митохондрии центрифугированием и выделяли из осадка РНК фенольно-детергентным методом (³). Полученный продукт анализировали в градиенте плотности сахарозы 5—30% на буфере: 0,01M трис-HCl, pH 7,2, 0,1M NaCl, 10^{-3} M ЭДТА. Центрифуга. Спинко Л2, ротор SW 25-1, 18 000 об/мин, 11 час. Маркеры: 28S и 18S рибосомальные РНК.

Анализ показал (рис. 1), что радиоактивность распределяется в виде двух пиков, один из которых гомогенен и располагается в области 40S, а другой ха-

рактеризуется гетерогенностью и занимает зону 26—20S. Кроме того, на диаграмме в верхушечной зоне градиента имеется еще радиоактивность, которая, по-видимому, соответствует продуктам деградации H^3 -РНК. После обработки фракций параллельно поставленного градиента РНКазой пик 40S оказался чувствительным к РНКазе, а в области 20S получен рибонуклеазо-резистентный материал. На основании этих данных можно заключить, что большая часть внедрившейся вирионной РНК (пик 40S), по-видимому, не подвергается репликации и частично разрушается. Наряду с этим, часть вирионной РНК служит матрицей в процессе репликации, и пик 20S может быть идентифицирован как репликативная форма РНК. Такая форма РНК обычно обнаруживается в инфицированных вирусом в.э.л. клетках и, по-видимому, представлена двунитчатыми структурами, резистентными к РНКазе (¹⁵). Образование репликативной формы РНК служит косвенным доказательством синтеза в митохондриях вирусспецифической РНК-полимеразы. Отсутствие на диаграмме седиментации продуктов транскрипции митохондриальной ДНК объясняется действием актиномицина, подавляющего митохондриальную транскрипцию и реутилизацию радиоактивных продуктов распада вирионной РНК.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности проникновения вирусной РНК в митохондрии и включения ее в автономную систему синтезов за счет энергии, генерируемой митохондриями. При этом происходит подавление транскрипции митохондриальной ДНК и пе-

реключение транскрипции и трансляции митохондрий на вирусспецифические синтезы РНК и белка, на репликацию вирусной РНК.

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
5 V 1971

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. Б. Казакова, К. А. Маркосян, М. М. Гачава, Биохимия, **34**, 1000 (1969). ² С. А. Нейфах, В. С. Туровский, Э. Х. Сафарян, Мол. биол., **3**, 495 (1969). ³ Л. С. Рахимбекова, В. С. Гайцхоки, Мол. биол., **3**, 315 (1969). ⁴ В. С. Гайцхоки, О. И. Киселеви др., Биохимия, **36**, 61 (1971). ⁵ D. Coen, J. Deutsch et al., In: Control of Org. Development, Cambridge, 1970, p. 449. ⁶ S. Nass, Intern. Rev. Cytol., **25**, 55 (1969). ⁷ Ф. И. Ершов, Л. В. Урываев, В. М. Жданов, ДАН, **190**, 458 (1970). ⁸ В. М. Жданов, Ф. И. Ершов, Л. В. Урываев, ДАН, **189**, 882 (1969). ⁹ В. М. Жданов, Ф. И. Ершов и др., Вопр. вирусол., **1**, 38 (1970). ¹⁰ Ф. И. Ершов, В. М. Жданов, Л. В. Урываев, ДАН, **189**, 647 (1969). ¹¹ Ф. И. Ершов, Л. В. Урываев, В. М. Жданов, Вопр. вирусол., **3**, 322 (1970). ¹² Ф. И. Ершов, В. М. Жданов, Л. В. Урываев, Вопр. вирусол., **5**, 551 (1969). ¹³ Д. Сабадош, Биохимия, **36**, № 2 (1971). ¹⁴ C. Schnaitman, V. G. Ervin, J. M. Greenwalt, J. Cell Biol., **32**, 719 (1967). ¹⁵ V. M. Zhdanov, F. I. Yershov, L. V. Uryvayev, Virology, **38**, 355 (1969).