

А. П. ПЕРЕВОЗЧИКОВ, Ю. П. ЗЕРОВ, Г. Ф. ПЛУЖНИКОВА,  
Э. А. РАТОВИЦКИЙ, М. Н. КИПРИАНОВА, П. Г. КНЯЗЕВ, И. Ф. СЕЙЦ

## РНК-ПОЛИМЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ВИРИОНАХ ОНКОРНАВИРУСОВ И ЕЕ СВЯЗЬ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ

(Представлено академиком Е. М. Крепом 12 VIII 1974)

В настоящее время имеется достаточно сведений о молекулярном механизме действия РНК-направляемой ДНК-полимеразы (Е.2.7.7.7.) онкорнавирусов<sup>(1)</sup>. Как известно, она катализирует синтез ДНК при наличии затравки, роль которой в вирионах выполняет низкомолекулярная РНК<sup>(2)</sup>. РНК-направляемая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза) по своим физико-химическим свойствам и по виду синтезируемого продукта может быть отнесена к классу ДНК-полимераз, которые описаны у прокариотов<sup>(3)</sup> и у эукариотов<sup>(4)</sup>. Синтез ДНК, осуществляемый ДНК-полимеразами в бактериальных системах и в клетках высших животных, также требует низкомолекулярной РНК-затравки. Более того, известно, что акт инициации синтеза (репликации) ДНК заключается в синтезе затравочной РНК, катализируемой РНК-полимеразой<sup>(5, 6)</sup>. Синтез РНК-затравки и ее связь с образующейся ДНК показаны также для онкогенного ДНК-содержащего вируса полиомы<sup>(7, 8)</sup>. Нельзя еще сказать ничего определенного о нуклеотидном составе и последовательности оснований в РНК-затравках. В связи с этим вызывают большой интерес работы по стимуляции репликации ДНК в бактериальных и животных системах отдельными рибонуклеозидтрифосфатами и в частности АТФ<sup>(9-11)</sup>. Считают, что АТФ участвует в инициации репликации ДНК, либо непосредственно вовлекаясь в комплекс матрица — фермент — затравка<sup>(10, 11)</sup>, либо служит субстратом (в большей степени, чем остальные нуклеозидтрифосфаты, НТФ) для синтеза затравки<sup>(12)</sup>. В этом смысле показательна существенная стимуляция репликации ДНК вируса полиомы и синтеза ДНК обратной транскриптазой в вирионах вируса саркомы Рауса (штамм Шмидт — Рушши) АТФ<sup>(8, 13)</sup>. В предыдущих работах, выполненных в нашей лаборатории, сообщалось о свойствах обнаруженной нами РНК-полимеразной активности в вирионах вируса саркомы Рауса, штамм Карр — Зильбер (ВСР-К-3) и вируса птичьего миелобластома<sup>(14-16)</sup>. Ниже приводятся данные о характере взаимосвязи РНК-полимеразной и ДНК-полимеразной активностей в вирионах этих онкорнавирусов. Сообщаются также данные о различном влиянии отдельных рибонуклеозидтрифосфатов на синтез ДНК в реакции обратной транскрипции.

Существенным моментом работы явилось получение белковых препаратов очищенного вируса, свободных от РНК и несущих обе названные активности. Солюбилизация ферментов достигалась обработкой очищенных в градиенте сахарозы (15—60%) вирионов неионным детергентом тритон-Х100 по методу Фэраса и др.<sup>(17)</sup>, затем следовала очистка препаратов от остатков разрушенной эндогенной РНК гель-фильтрацией на сефадексе G-75. Как РНК-полимеразная, так и ДНК-полимеразная активности почти полностью зависели от добавления к белковым препаратам экзогенной РНК (например, РНК, выделенной из ВСР фенольно-детергентным методом). Активности обоих изучаемых ферментов были в основном локализованы в высокомолекулярной фракции.

Взаимодействие РНК-полимеразной и ДНК-полимеразной активностей в белковых препаратах вирионов вируса саркомы Рауса (Карр — Зильбер)  
(данные двух опытов)

Система для определения	Вид РНК	Включение метки в ТХУ-осадок *			
		полная система		+НТФ или дНТФ **	
		имп/мин на 1 мг белка	индекс стимуляции	имп/мин на 1 мг белка	индекс стимуляции
I ***	РНК ВСП	7500	5	1400	9
		3340	3	6340	6
II ***	РНК кролика	15500	10	4700	3
	РНК ВСП	8700	6,5	5100	4
		5800	3,6	2800	1,7

\* Приведены активности за вычетом их величины в контрольных, неинкубированных пробах ( $A_{оп} - A_R$ ), в расчете на 1 мг вирусного белка, и индексы стимуляции включения ( $(A_{оп} - A_R) / A_R$ ).

\*\* +НТФ — для ДНК-полимеразы и +дНТФ — для РНК-полимеразы.

\*\*\* I — Система для определения ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы); II — система для определения РНК-полимеразы. В случае отсутствия РНК-матрицы в полной системе включение радиоактивности в ТХУ-нерастворимый осадок было равно фону.

При совместной работе обоих ферментов (добавление как НТФ, так и дНТФ в реакционную смесь) наблюдалось включение метки и в РНК, и в ДНК (табл. 1). Полная реакционная смесь содержала в 0,5 мл: 40 мкмоль трис-НСI, рН 8,0; 2 мкмоль  $MgCl_2$ ; по 0,1 мкмоль нуклеозидтрифосфатов (НТФ или дНТФ); 0,5 мкг меченого по  $^3H$  (1 мкС) или по  $^{14}C$  (0,5 мкС) НТФ или дНТФ, 50–100 мкг вирусного белка, свободного от РНК, и 3 мкг экзогенной РНК, а также 0,01% меркаптоэтанол. В ряде опытов вместо вирусного белка и экзогенной РНК использовали гомогенат вируса (50–100 мкг белка). При добавлении к белковым препаратам вируса саркомы Рауса экзогенной РНК ВСП в качестве матрицы в условиях одновременного синтеза ДНК и РНК имели место стимуляция синтеза ДНК и угнетение синтеза РНК (табл. 1). Если вместо РНК ВСП в реакционную смесь добавляли гетерологичную РНК (РНК слизистой желудка, обогащенную последовательностями поли-А), то синтез ДНК в присутствии субстратов для синтеза РНК (НТФ) угнетался. Таким образом, соотношения синтезирующихся РНК и ДНК, а следовательно, и характер взаимоотношений РНК-полимеразной и ДНК-полимеразной активностей менялся в зависимости от того, какая РНК используется в качестве матрицы: гомологичная или гетерологичная. Если в первом случае наблюдается кооперативное взаимодействие ферментов, то во втором, как можно предположить, имеет место конкуренция между ферментами за используемую РНК, что является в общем случае примером неспецифических взаимодействий между аналогичными по роду деятельности ферментами. Наблюдаемое кооперативное взаимодействие исследуемых ферментов мы связываем с актом инициации синтеза ДНК предшествующим ему синтезом РНК-затравки. Понятно, что такое взаимоотношение синтетических реакций может осуществляться только при использовании вирусспецифической матрицы, имеющей определенные места связывания для РНК- и ДНК-полимераз. Угнетение синтеза РНК при добавлении субстратов для синтеза ДНК (дНТФ) указывает на возможность определенной регуляции или ограничения синтеза РНК в условиях синтеза ДНК (прекращение синтеза РНК после того, как начался синтез ДНК). Сравнительно высокий уровень синтеза ДНК в отсутствие предшественников для синтеза РНК можно объяснить наличием определенного числа затравочных РНК, ассоциированных с высокомолекулярной фракцией изолированной нами РНК ВСП (?).

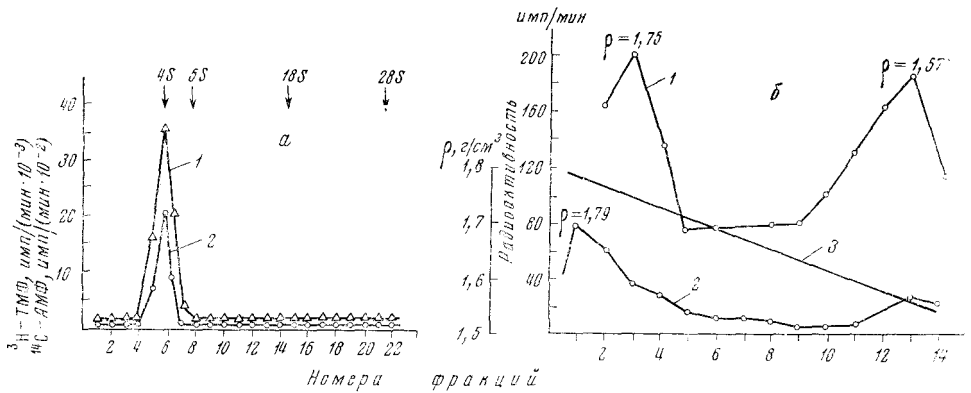


Рис. 1. Ассоциация продуктов совместной деятельности РНК-полимеразы и ДНК-полимеразы. Продукты выделяли фенол-детергентным методом. а — электрофорез в 2,5% полиакриламидном геле. В качестве маркеров использовалась цитоплазматическая РНК печени крысы. б — равновесное центрифугирование продуктов в градиенте CsCl этидийбромид. Ультрацентрифугирование в роторе 50Ti «Spinco» при 45 000 об/мин в течение 72 час., 15°. 1 —  $^3\text{H}$ -ДНК-продукт, 2 —  $^{14}\text{C}$ -РНК-продукт, 3 —  $\rho$

Предположение о синтезе РНК-затравки подкрепляется результатами опытов с равновесным центрифугированием в градиенте плотности CsCl с этидийбромидом продуктов совместной деятельности РНК- и ДНК-полимераз, один из которых метился  $^{14}\text{C}$  (РНК-продукт), а другой —  $^3\text{H}$  (ДНК-продукт) (рис. 1). Близкое совпадение плавучих плотностей  $^{14}\text{C}$ -продукта ( $1,79 \text{ г/см}^3$ ) и  $^3\text{H}$ -продукта ( $1,75 \text{ г/см}^3$ ) указывает на возможность их физической связи, если учесть, что плавучая плотность свободной ДНК составляет  $1,57 \text{ г/см}^3$ . На ранних стадиях реакции плавучие плотности обоих продуктов практически совпадают с плотностью свободной РНК (не показано), что предполагает первоочередность синтеза РНК в РНК — ДНК-продукте. Кроме того,  $^3\text{H}$ - и  $^{14}\text{C}$ -продукты мигрировали в одной зоне при электрофорезе в 2,5% полиакриламидном геле с подвижностью, совпадающей с подвижностью 4S тРНК, что также может свидетельствовать об их ассоциации (рис. 1б).

Чтобы определить роль отдельных рибонуклеозидтрифосфатов в инициации синтеза ДНК, мы исследовали влияние отдельных НТФ на об-

Таблица 2

Влияние отдельных рибонуклеозидтрифосфатов и их смеси на синтез ДНК препаратами вируса саркомы Рауса (Карр — Зильбер) и вируса птичьего миелобластоза

РНК	Индекс стимуляции включения метки в ТХУ-нерастворимый осадок *						
	полная система	+НТФ	+УТФ	+ГТФ	+ЦТФ	+АТФ	
ДНК-полимераза вируса саркомы Рауса (К-3)	Эндогенная	2	2,4	—	—	—	—
вируса птичьего миелобластоза	ВСР	5	9	0,6	0,6	1,0	3
	Эндогенная	7	20	14	—	—	22
То же	То же	2,5	9	—	—	—	—

\* См. примечания к табл. 1.

ратную транскрипцию. В табл. 2 суммированы данные по влиянию отдельных НТФ, а также их смеси на синтез ДНК как гомогенатами вирионов, так и препаратами вирусного белка с экзогенной матрицей. Для вируса птичьего миеобластома (ВПМ) мы наблюдали стимуляцию синтеза ДНК при добавлении как АТФ, так и смеси всех четырех НТФ (в эквимольных количествах). Добавление УТФ также стимулировало синтез ДНК, но в меньшей степени, чем АТФ или смесь НТФ. В случае ВСП-К-3 стимуляция синтеза ДНК наблюдается только при добавлении всех четырех НТФ. Добавление отдельных НТФ не только не стимулирует, но, наоборот, заметно подавляет синтез ДНК. При этом наименьшее подавление отмечается в случае добавления АТФ. Таким образом, характер влияния НТФ на синтез вирионами различных онкорнавирусов различен. В одном случае максимальная стимуляция достигается за счет одного АТФ (в нашем случае для ВПМ, а также для ВСП Шмидт — Руннин, по данным Мизутани и Темина<sup>(13)</sup>), а в другом она возможна в присутствии лишь всех четырех НТФ (ВСП-К-3), тогда как отдельные нуклеозидтрифосфаты угнетают синтез ДНК. Если принять во внимание, что во всех указанных случаях как в присутствии смеси НТФ (см. выше), так и в присутствии отдельных нуклеозидтрифосфатов<sup>(2, 15)</sup> имеет место синтез ДНК, следует допустить, что стимуляция синтеза ДНК отдельными НТФ определяется величиной вклада каждого предшественника в синтезируемую РНК-затравку, которая, вероятно, специфична для каждого типа вирусов (по аналогии с инициацией синтеза ДНК вируса полиомиелита<sup>(8)</sup>). В случае, когда ни одно из оснований не превалирует в РНК-затравке, необходимо наличие всех четырех НТФ. Остается открытым вопрос относительно способа синтеза РНК-затравки. Предстоит выяснить, осуществляется ли он в каждом случае матричной РНК-полимеразой, либо за ее синтез ответственны терминальные (добраивающие конец цепи РНК) гомополинуклеотидполимеразы онкорнавирусов.

Научно-исследовательский институт онкологии  
им. Н. Н. Петрова  
Ленинград

Поступило  
28 VI 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> In: *Molecular Biology of Tumor Viruses*, Ed. by J. Tooze, 1973. <sup>2</sup> A. J. Faras, W. E. Lewinson et al., *Virology*, v. 58, 126 (1974). <sup>3</sup> M. J. Modak, S. L. Marcus, L. Cavalieri, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 56, 247 (1974). <sup>4</sup> J. Stavrianopoulos, J. Karakas, E. Chargaff, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 69, 2609 (1972). <sup>5</sup> A. Sugino, S. Hirose, R. Okazaki, *ibid.*, v. 69, 1863 (1972). <sup>6</sup> K. Kumar, D. Friedman, *Nature New Biol.*, v. 239, 74 (1972). <sup>7</sup> R. Sadoff, W. Cheevers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 53, 818 (1973). <sup>8</sup> G. Magnusson, V. Pigiet et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 70, 412 (1973). <sup>9</sup> W. Wicker, A. Kornberg, *ibid.*, v. 70, 3679 (1973). <sup>10</sup> A. Klein, F. Bonhoeffer, *Ann. Rev. Biochem.*, v. 41, 301 (1972). <sup>11</sup> O. Bernard, T. Brent, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 53, 1213 (1973). <sup>12</sup> C. Majumdar, F. Frankel, *Nature*, v. 243, 33 (1973). <sup>13</sup> S. Mizutani, H. M. Temin, *J. Virol.*, v. 8, 469 (1971). <sup>14</sup> А. П. Перевозчиков, О. К. Кузнецов и др., В сб. *Канцерогенез*, Киев, 1973, стр. 96. <sup>15</sup> А. П. Перевозчиков, О. К. Кузнецов и др., *ДАН*, т. 209, 1445 (1973). <sup>16</sup> J. F. Seitz, A. P. Perevozchikov et al., *Abstr. IX Intern. Congr. Biochem.*, July, 1-7, Stockholm, 1973. <sup>17</sup> A. J. Faras, J. M. Taylor et al., *Biochemistry*, v. 11, 2334 (1972).