

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

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНФОРМАЦИОННЫХ РНК,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛЕТОК КРЕБС-II,
ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА**

(Представлено академиком А. С. Спириным 11 V 1975)

Заражение клеток пикорнавирусами приводит к угнетению синтеза клеточных белков и распаду полисом клетки-хозяина ⁽¹⁾. В связи с этим нас интересовала судьба клеточных мРНК в зараженных клетках. Ранее нами было показано, что в клетках Кребс-II после их заражения вирусом энцефаломиокардита (ЭМК) не происходит существенного ускорения распада клеточных мРНК ⁽²⁾. Сходные данные на близких системах были одновременно получены в двух других лабораториях ^(3, 4).

В настоящей работе изучали функциональную активность мРНК клеток Кребс-II, инфицированных вирусом ЭМК: из зараженных клеток на той стадии инфекции, когда суммарный синтез представлен в значительной степени вирусспецифическими полипептидами, выделяли мРНК и транслировали ее в бесклеточных экстрактах, полученных из незараженных клеток. Показано, что по матричной активности клеточные мРНК, выделенные из зараженных клеток и очищенные от основной массы вирусспецифических РНК, существенно не отличаются от мРНК из нормальных клеток.

Клетки Кребс-II, незараженные и зараженные вирусом ЭМК со множественностью 20 б.о.е. на клетку, инкубировали при 37° в течение 4,5 час. К концу этого периода происходит частичное угнетение суммарного синтеза белка и замещение клеточного синтеза вирусспецифическим ⁽⁵⁾. Выделение цитоплазматической поли(А)-содержащей РНК проводили по ранее описанному методу ⁽⁶⁾. Матричную активность РНК определяли в системе, содержащей преинкубированную фракцию S₂₀, выделенную из незараженных клеток Кребс-II ⁽⁶⁾. Отличие состояло в том, что количество фракции S₂₀, вносимое в пробу, увеличили с 1,0 ед. A₂₆₀ до 2,5–3,0 ед. A₂₆₀. С увеличением концентрации экстракта эффективность трансляции мРНК существенно возрастает (данные не представлены), поэтому введенная модификация позволила определять матричную активность столь малых количеств РНК, как 0,1–0,5 мкг.

Препараты поли(А)-содержащих РНК из зараженных клеток стимулировали включение меченых аминокислот в бесклеточной системе. Их активность составляла от 80 до 140% от активности препаратов РНК из незараженных клеток. Однако по этим данным нельзя судить о функциональной активности собственно клеточных мРНК, так как в состав препаратов поли(А)-содержащих РНК из зараженных клеток могут входить не только клеточные мРНК, но и разные формы вирусспецифических РНК: одноцепочечная вирусная РНК, которая транскрибируется *in vitro* с эффективностью в несколько раз превышающей эффективность трансляции суммарной мРНК клеток Кребс-II и двуцепочечные РНК — репликативная форма (р.ф.) и репликативный предшественник (р.п.), которые пегмбилируют транслирующий аппарат клеток животных, в том числе и клеток Кребс-II ⁽⁷⁾. Для оценки вклада разных форм РНК в суммарный эффект, мы подвергли препараты поли(А)-содержащих РНК фракционированию по скорости седиментации и исследовали матричную активность каждой фракции.

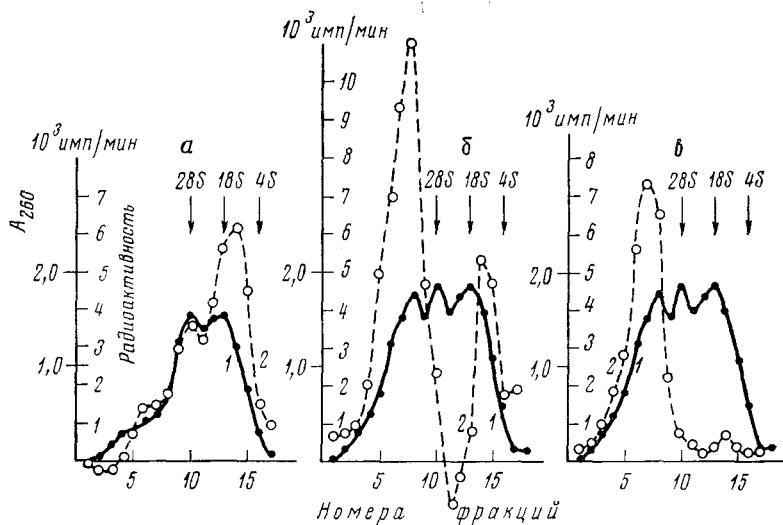


Рис. 1. Седиментограммы и трансляционные профили поли(А)-содержащих РНК, выделенных из незараженных (а) и зараженных вирусом ЭМК (б, в) клеток. 1 — оптическая плотность, 2 — стимуляция включения ^{14}C -лизина при добавлении в бесклеточную систему 10 мкл соответствующей фракции градиента (цифры даны за вычетом эндогенного включения). Условия трансляции: а и б — 3,5 мМ MgCl_2 и 85 мМ KCl , в — 4,5 мМ MgCl_2 и 105 мМ KCl

Фракционирование РНК проводили в градиенте сахарозы 5–20%, приготовленном на буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ KCl и 0,1 мМ ЭДТА в роторе SW_{27} при 21 000 об/мин в течение 16 час.

Седиментационный профиль мРНК из незараженных клеток представляет характерную двугорбую кривую с плечом в зоне тяжелых РНК (рис. 1а). Судя по наличию максимумов в области 18S и 28S, препараты мРНК содержат примесь небольших количеств рРНК. Матричной активностью обладают практически все фракции, однако с наибольшей эффективностью транслируются легкие РНК, седиментирующие медленнее 18S.

Седиментационный профиль РНК из зараженных клеток отличается появлением дополнительного пика оптической плотности. По положению в градиенте (35–37S) материал этого пика соответствует вирионной РНК.

Трансляционный профиль РНК из зараженных клеток (рис. 1б) значительно отличается от контрольного. С наибольшей эффективностью транслируются тяжелые ($>28\text{S}$) РНК. Этот пик активности связан, во всяком случае частично, с вирионной РНК. Действительно, эффективность трансляции тяжелых РНК уменьшается значительно слабее, чем эффективность трансляции легких РНК при увеличении концентрации солей в инкубационной смеси до 4,5 мМ MgCl_2 и 105 мМ KCl вместо обычных 3,5 мМ MgCl_2 и 85 мМ KCl (рис. 1в). По нашим данным, в этих измененных условиях трансляция РНК вируса ЭМК происходит достаточно эффективно, а считывание клеточных матриц почти полностью прекращается. РНК, седиментирующие в области 20–25S, значительно хуже стимулируют включение меченых аминокислот, а в ряде случаев даже ингибируют остаточное эндогенное включение в преинкубированных экстрактах. Эффекты, по всей вероятности, связаны с присутствием двуспиральных вирусспецифических РНК в этой зоне градиента — р.ф., седиментирующей в виде пика с коэффициентом седиментации 20S и р.п., представляющего собой гетерогенный материал с коэффициентом седиментации больше 20S. Второй пик транслирующихся РНК по расположению соответствует легким клеточным мРНК и находится в зоне, свободной от основной массы

вируспецифических РНК. Удельная функциональная активность этих РНК примерно на 30% ниже, чем у соответствующих фракций контрольного препарата.

Далее мы решили более детально сравнить матричную активность легких (<18S) мРНК из нормальных и зараженных клеток. Поскольку цельзя исключить наличие некоторого количества двуспиральной РНК и в легкой зоне градиента, в дальнейшем до фракционирования в ультрацентрифуге проводили дополнительную очистку препарата мРНК от двуспиральных РНК путем хроматографии на целлюлозе CF-11 (Ватман) ⁽⁸⁾. Об эффективности приема можно судить по результатам модельного опыта (рис. 2).

Поли(А)-содержащую РНК

смешивали с очищенной р.ф. вируса ЭМК, меченной по ³H-уридину, и наносили на колонку с целлюлозой CF-11 в буфере, содержащем 10 мМ трис-HCl, рН 7,6, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 15% этанол. Материал, не задерживающийся на колонке в этих условиях, содержит 94% нанесенной однопечечной поли(А)-содержащей РНК (судя по оптической плотности) и только 2,5% меченой р.ф. (рис. 2). Таким образом, за один цикл хроматографии при незначительных потерях мРНК из смеси удаляется более 95% двуспиральных РНК. После этой операции эффективность трансляции суммарной поли(А)-содержащей РНК из зараженных клеток увеличивается в 2–3 раза (рис. 3а). Частично очищенные таким способом препараты РНК фракционировали центрифугированием в градиенте сахарозы (26 000 об/мин, 21 час.). Для исследования матричной активности собирали РНК, седиментирующую в области между 4S и 18S. Специальный опыт с использованием меченой р.ф. вируса ЭМК показал, что во фракцию 4–18S при выбранном режиме центрифугирования попадает не более 20% р.ф., имеющейся в препарате. Следовательно, после принятой двуступенчатой процедуры очистки во фракции легких мРНК остается менее 0,5% р.ф., исходно присутствовавшей в препарате поли(А)-содержащей РНК из зараженных клеток.

Как показано на рис. 3б, эффективность трансляции легких мРНК из зараженных клеток практически не отличается от таковой для соответствующих РНК контрольных клеток. Эти данные несколько отличаются от результатов работы, в которой было показано, что мРНК, выделенная из клеток плазмцитомы, зараженных вирусом ЭМК, транслируется примерно в два раза хуже, чем мРНК из незараженных клеток ⁽⁴⁾. Остается неясным, действительно ли наша система отличается по этому признаку от описанной в литературе или же различия результатов обусловлены особенностями методических подходов (в частности, нельзя исключить наличия небольших примесей вирусной РНК в наших препаратах клеточных мРНК и наличия р.ф. в препаратах РНК, использованных в работе ⁽⁴⁾). Тем не менее, наши результаты показывают, что больших различий в матричной активности легких мРНК из нормальных и зараженных клеток, очевидно, нет. Поскольку синтез всех клеточных белков при вирусной инфекции угнетается равномерно ⁽⁴⁾, выводы, сделанные на основании изучения легких мРНК, кажется, возможным экстраполировать и на другие классы

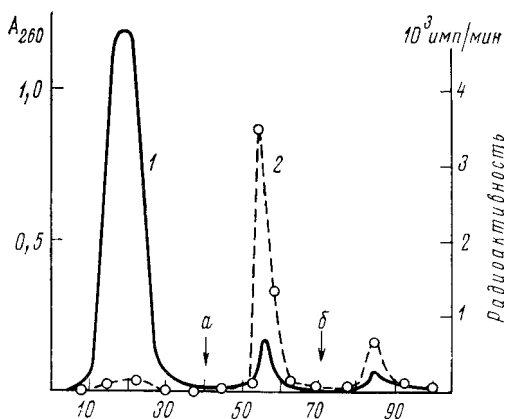


Рис. 2. Фракционирование на целлюлозе CF-11 смеси поли(А)-содержащих РНК из незараженных клеток и р.ф. вируса ЭМК, меченной по ³H-уридину. 1 — оптическая плотность, 2 — радиоактивность; а — элюция буфером без этанола, б — элюция Н₂О.

клеточных мРНК из зараженных клеток. Таким образом, мы приходим к заключению, что клеточные мРНК, не транслирующиеся в зараженных клетках, сохраняют в значительной степени или полностью свою функциональную активность и, следовательно, угнетение синтеза клеточных белков при вирусной инфекции не может быть объяснено прямой инактивацией клеточных матриц.

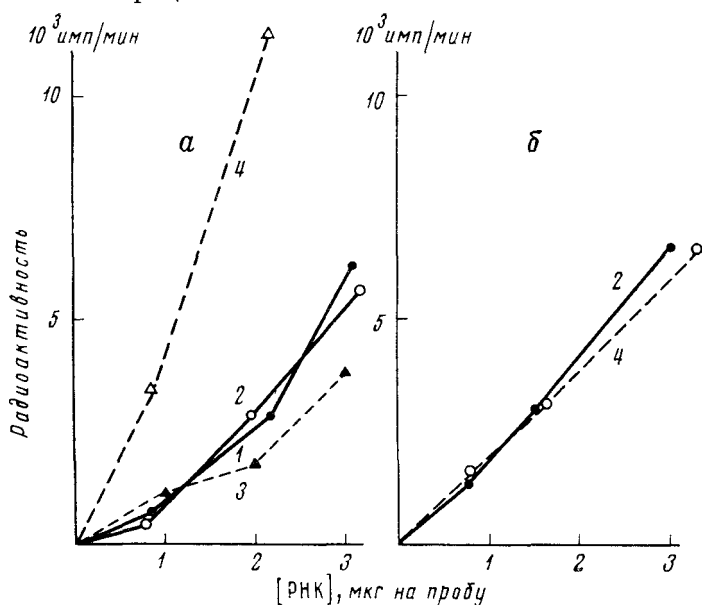


Рис. 3. Функциональная активность мРНК из зараженных клеток до и после удаления вирусспецифических форм РНК. а — тотальные препараты поли(А)-содержащих РНК, б — фракции легких РНК. РНК из незараженных (1, 2) и из зараженных (3, 4) клеток, до (1, 3) и после (2, 4) фракционирования на целлюлозе CF-11

Ранее при сравнении экстрактов из нормальных и зараженных вирусом ЭМК клеток Кребс-П нами было показано, что белоксинтезирующая активность экстрактов из зараженных клеток значительно снижена, при этом хуже транслируются как экзогенные клеточные, так и вирусные РНК⁽⁵⁾. Можно предположить, что в ответ на вирусную инфекцию в клетке развивается общее угнетение синтеза белка, возможно, в результате блокирования одной из стадий инициации^(9, 10). Предпочтительную трансляцию вирусных РНК на поздних стадиях инфекции можно было бы объяснить тем, что вирусные матрицы способны успешно конкурировать с клеточными за лимитирующий компонент белоксинтезирующего аппарата⁽⁴⁾.

Выражаем благодарность Т. Г. Сенкевич, предоставившей нам р.ф. вируса ЭМК, меченную по ^3H -уридину.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
7 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. М. Martin, I. M. Kerr, *Molecular Biology of Viruses*, Cambridge, 15 (1968).
- ² В. А. Гиневская, Ю. В. Севткин и др., ДАН, т. 219, 477 (1974). ³ D. S. Colby, V. Fiterly et al., J. Virol., v. 13, 858 (1974). ⁴ C. Laurence, R. E. Thach, J. Virol., v. 14, 598 (1974). ⁵ Т. Ю. Угарова, Ю. В. Севткин и др., ДАН, т. 214, 1210 (1974). ⁶ Т. Ю. Угарова, Ю. В. Севткин и др., ДАН, т. 211, 996 (1973). ⁷ H. D. Robertson, M. B. Mathews, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 225 (1973). ⁸ Р. Эриксон, В сб.: Методы вирусологии и молекулярной биологии. «Мир», М., 1972, стр. 370. ⁹ R. Leibowitz, S. Penman, J. Virol., v. 8, 661 (1971). ¹⁰ C. Darnbrough, T. Hunt, R. J. Jackson, Bioch. Bioph. Res. Com., v. 48, 1556 (1972).