

И. П. ПУМПЕН, Э. Я. ГРЕН

РОЛЬ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА В РЕГУЛЯЦИИ РЕПЛИКАЦИИ РНК-СОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИОФАГОВ

(Представлено академиком А. А. Баевым 20 V 1975)

Репликация РНК у РНК-содержащих фагов осуществляется индуцируемой в зараженных клетках РНК-репликазой (¹⁻³), состоящей из одной фаговой и нескольких клеточных субъединиц (^{4, 5}). Образование фагоспецифического белка репликазы протекает интенсивно лишь на раннем этапе инфекции, когда накопилось еще мало белка оболочки — репрессора трансляции гена белка репликазы (⁶⁻⁸). Соответственно, к 20—25-й мин. инфекции достигает максимума и репликазная активность в зараженных клетках (⁹⁻¹¹). В отсутствие синтеза белка оболочки в клетках, зараженных неполярными мутантами по гену этого белка, синтез белка репликазы и рост репликазной активности продолжают в течение более длительного времени (⁶⁻¹¹).

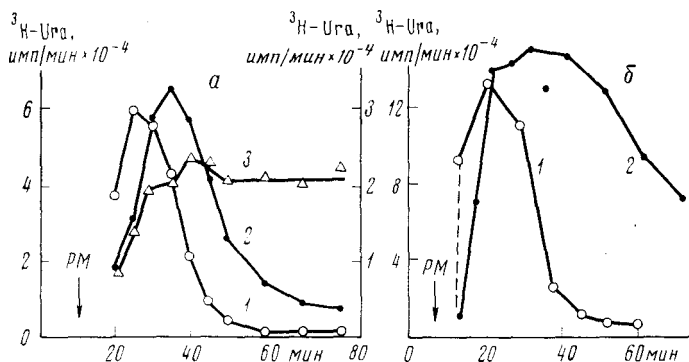


Рис. 1. Скорость синтеза фаговой РНК в клетках, зараженных фагами. а — Qβ (1 — *E. coli* S26R1E — левая ордината) и Qβam12 (2 — *E. coli* S26R1E, 3 — *E. coli* AB259 — правая ордината); б — MS2 (1 — *E. coli* AB259, 2 — *E. coli* Q13). РМ — рифампицин

В настоящей работе показано, что основные параметры цикла репликации фаговой РНК, т. е. его продолжительность и характер изменения скорости синтеза РНК во времени, непосредственно определяются синтезом белка репликазы. Постоянное обновление последнего необходимо для эффективного синтеза РНК. Вследствие этого определяющие синтез белка репликазы факторы, в первую очередь накопление белка оболочки, формируют цикл репликации РНК.

В работе были использованы препараты бактериофагов MS2, Qβ и Qβam12, амбер-мутанта по гену белка оболочки (¹¹), и компонентные к указанным фагам штаммы *Escherichia coli*: Q13 RNaseI⁻, AB259 Hfr3000⁺ (Su⁻), S26 R1E (Su1). Выращивание зараженных культур и определение скорости синтеза фаговой РНК двухминутной меткой ³H-урацилом (удельная радиоактивность 6 С/ммоль) в присутствии рифамицина (200 мкг/мл) проводили как описано ранее (¹²). Скорость синтеза белка определяли по включению ¹⁴C-фенилаланина (270 мС/ммоль) в нерастворимую в горячей ТХУ фракцию. Выделение и анализ меченных ³H-аминокислотами фаговых белков электрофорезом в 10% полиакриламидном геле проводили в основном согласно (¹³).

Из рис. 1 следует, что параметры цикла репликации РНК определяются, во-первых, способностью фага к производству белка оболочки (рис. 1а), во-вторых, свойствами клетки-хозяина (рис. 1б). В первом случае наблюдаемое удлинение цикла репликации РНК (рис. 1а, 2 и 3) коррелирует с известными из литературы изменениями в характере синтеза фагового белка репликазы в клетках, зараженных амбер-мутантами по гену белка оболочки, в отсутствие синтеза белка оболочки (*E. coli* Su⁻) или при его ограничении (*E. coli* Su1, при неполной супрессии мутации) (⁶⁻¹¹). Что же

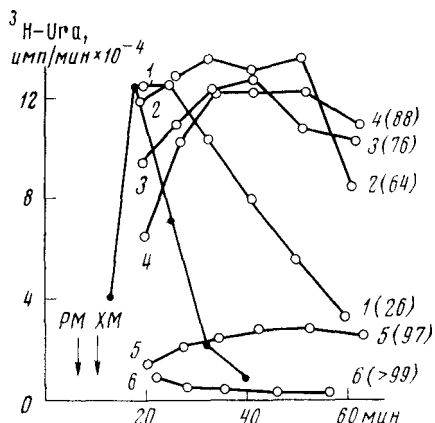


Рис. 2. Скорость синтеза РНК MS2 в клетках *E. coli* AB259 в присутствии хлорамфеникола (1 — 2 мкг/мл, 2 — 10, 3 — 20, 4 — 50, 5 — 200 мкг/мл) и тетрациклина (6 — 200 мкг/мл). Цифры в скобках обозначают степень подавления скорости синтеза белка (в процентах). *K* — контроль, *PM* — рифамицин, *ХМ* — хлорамфеникол

касается различий в характере циклов репликации РНК MS2 в клетках *E. coli* Q13 и *E. coli* AB259, то они также сводятся к разнице в относительной эффективности синтеза белка репликазы. Если MS2 в клетках *E. coli* AB259 с 10-й по 40-ю мин. инфекции синтезирует белок репликазы, А-белок и белок оболочки в отношении 3:24:100 (по данным электрофореза в ПАГ), то в клетках *E. coli* Q13 это соотношение равно 11:8:100 (с 10-й по 60-ю мин. инфекции). Таким образом, более высокий уровень синтеза репликазы в последнем случае сопровождается и более длительным накоплением РНК.

Имея в виду, что трансляция гена белка репликазы подвержена контролю со стороны белка оболочки, полученные нами данные о цикле репликации РНК дают основание предположить, что синтез репликазы, определяемый накоплением белка оболочки, непосредственно связан с продолжительностью синтеза РНК в зараженной клетке. Для проверки этого положения было определено, каким образом возрастающее подавление белкового синтеза в клетках, зараженных фагом MS2, сказывается на характере репликации фаговой РНК.

Частичное подавление белкового синтеза приводит к удлинению цикла репликации РНК (рис. 2, 1—5). При этом характер эффекта определяется исключительно степенью подавления синтеза белка и не зависит от механизма действия примененных ингибиторов: хлорамфеникола, тетрациклина, стрептомицина и гентамицина, валина (угнетающего синтез изолейцина). Для бактериофага Q β были получены аналогичные данные. Недавно появилось сообщение, что спад белкового синтеза в результате голодания зараженных фагом f2 клеток *E. coli* по путресцину также приводит к пролонгированному синтезу РНК (¹⁴).

Причина удлинения цикла репликации РНК в снижении скорости накопления белка оболочки, что резко изменяет соотношение вновь синтезируемых белков (в условиях остаточного белкового синтеза порядка 10%) в пользу белка репликазы (рис. 3). Количество последней оказывается вполне достаточным для достижения максимальных скоростей синтеза РНК. Таким образом, снятие репрессии синтеза белка репликазы в этом случае оказывается более существенным фактором, чем снижение общей

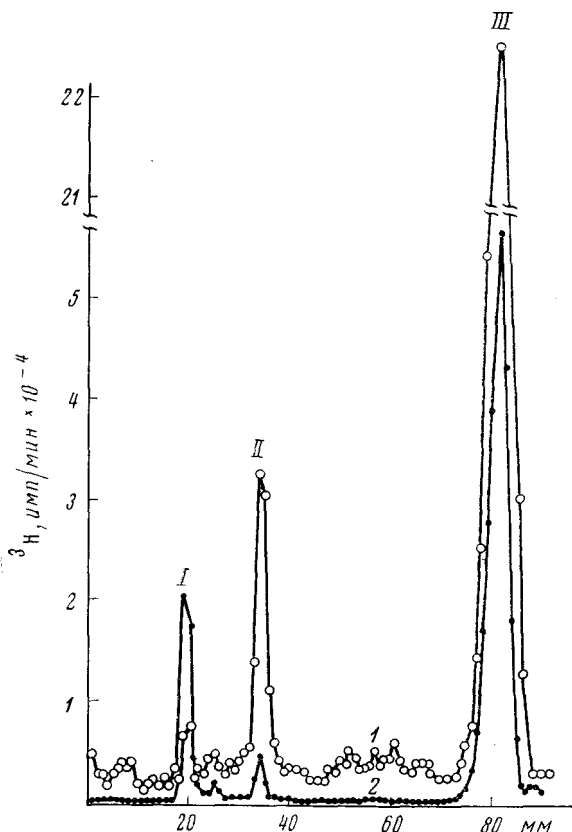


Рис. 3. ПАГ-электрофорез белков MS2, синтезированных с 20-й по 60-ю мин. инфекции в клетках *E. coli* AB259, обработанных рифамицином на 3-й мин. 1 — без хлорамфеникола, 2 — хлорамфеникол (50 мкг/мл) на 15-й мин. Для 1: II: III = 1:9:100; для 2: I: II: III = 21:4:100

первых, на поздней стадии нормальной инфекции и, во-вторых, при полном подавлении дальнейшего образования репликазы высокими концентрациями ингибиторов белкового синтеза. Отсюда следует вывод, что продолжающийся синтез РНК требует постоянного обновления репликазы, вследствие чего репрессия трансляции гена белка репликазы белком оболочки определяет продолжительность и характер цикла репликации фаговой РНК

Авторы приносят глубокую благодарность В. Р. Бауману за обеспечение микробиологической части работы.

Институт органического синтеза
Академии наук ЛатвССР
Рига

Поступило
15 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. T. August, S. Cooper et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., v. 28, 95 (1963).
- ² I. Haruna, K. Nozu et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 49, 905 (1963).
- ³ C. Weissmann, L. Simon et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., v. 28, 99 (1963).
- ⁴ R. Kamen, Nature, v. 228, 527 (1970).
- ⁵ M. Kondo, R. Gallerani, C. Weissmann, Nature, v. 228, 525 (1970).
- ⁶ E. Viñuela, I. D. Algranati, S. Ochoa, Europ. J. Biochem., v. 1, 3 (1967).
- ⁷ E. Viñuela, I. D. Algranati et al., Biochim. et biophys. acta, v. 155, 558 (1968).
- ⁸ D. Nathans, M. P. Oeshger et al., J. Mol. Biol., v. 39, 279 (1969).
- ⁹ H. F. Lodish, S. Cooper, N. D. Zinder, Virology, v. 24, 60 (1964).
- ¹⁰ H. F. Lodish, N. D. Zinder, J. Mol. Biol., v. 19, 333 (1966).
- ¹¹ K. Horiuchi, S. Matsushashi, Virology, v. 42, 49 (1970).
- ¹² П. П. Пумпен, В. Р. Бауман и др., Изв. АН ЛатвССР, № 3, 51 (1974).
- ¹³ H. P. M. Fromageot, N. D. Zinder, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 61, 184 (1968).
- ¹⁴ D. Y. Young, P. R. Srinivasan, J. Bacteriol., v. 117, 1280 (1974).

скорости синтеза фаговых белков. Время, необходимое для накопления репрессорных концентраций белка оболочки, возрастает с повышением степени угнетения синтеза белка, что сказывается, в свою очередь, на скорости синтеза фаговой РНК (рис. 2, 1–4). Существенное сокращение остаточного белкового синтеза резко снижает скорость синтеза РНК вплоть до полного его прекращения (рис. 2, 5–6).

В целом, полученные результаты показывают, что основные параметры цикла репликации фаговой РНК непосредственно связаны с синтезом белка репликазы. Наличие синтеза последнего обеспечивает восходящую ветвь скорости синтеза РНК в нормальном цикле и удлиненный цикл репликации РНК при отсутствии или замедлении накопления белка оболочки. Отсутствие синтеза репликазы приводит через некоторое время к падению синтеза РНК. Это имеет место, во-