

А. С. АГАБАЛІАН

БИОСИНТЕЗ ВИРУСНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В работе обсуждаются вопросы синтеза нуклеиновых вирусов. В свете последних литературных данных рассматриваются механизмы репликации РНК- и ДНК-содержащих вирусов, регуляции синтезов вирусных РНК и ДНК. Обсуждаются также особенности репродукции онкорнавирусов, функции вирусной РНК-полимеразы, синтезированной *de novo* вирусной РНК-полимеразы и обратной транскриптазы (РНК зависимой ДНК-полимеразы). Рассматривается синтез вирусспецифических РНК в клетках, инфицированных РНК-содержащими вирусами, и их роль в репродукции вирусов.

Вирусы содержат в своем составе нуклеиновые кислоты, однако, в отличие от всех других форм жизни, в состав их входит лишь один вид нуклеиновой кислоты. На этом основании они делятся на две большие группы: РНК- и ДНК-содержащие.

Полный цикл репродукции вирусов состоит из ряда определенных стадий, приводящих к образованию полноценного вирусного потомства. Условно эти стадии могут быть разделены на начальный период, во время которого происходит адсорбция, проникновение и депротенизация вирусных частиц в клетке, средний период, в течение которого осуществляется синтез ранних вирусных белков, часть которых подавляет нормальный клеточный метаболизм, а другая часть обеспечивает репликацию вирусных нуклеиновых кислот и синтез вирусных компонентов, и наконец третий, конечный период, когда происходит формирование вирионов и освобождение вируса.

Исследования *in vivo* позволили получить наиболее значительную информацию о биосинтезе вирусных РНК. Эти исследования осуществляются несколькими путями: 1) заражение клеток очищенным вирусом с меченой нуклеиновой кислотой и последующим определением ее судьбы в инфицированных клетках, 2) заражение клеток вирусом в условиях блокированного синтеза клеточной РНК и инкубирования в среде, содержащей меченый предшественник РНК, с дальнейшим фракционированием вновь синтезированной РНК.

Фракционирование производят в основном ультрацентрифугированием в градиентах плотности сахарозы и сернокислого цезия, а также путем электрофореза препаратов нуклеиновых кислот в полиакриламидном геле. Существенную роль в процессе изучения синтеза вирусных нуклеиновых кислот играет определение их инфекционных свойств.

Для синтеза вирусных РНК используются те же субстраты, которые имеются в незараженной клетке (АТФ, ГТФ, ЦТФ, и УТФ). До

настоящего времени не обнаружены вирусы, РНК которых имела бы в своем составе какие-то необычные основания, отсутствующие в составе клеточных РНК, что имеет место в случае некоторых ДНК-содержащих вирусов. Это является одним из существенных отличий в процессах синтеза вирусных РНК и ДНК.

Как уже упоминалось выше, в зараженной клетке в течение среднего периода происходит перестройка метаболизма клетки и синтез компонентов вируса. Эти процессы осуществляются с помощью так называемых «ранних» белков, синтезируемых в клетке после ее инфицирования. На модели бактериофагов было показано, что ранние белки синтезируются сразу же после проникновения в клетку вирусной нуклеиновой кислоты и появление их всегда предшествует синтезу компонентов вируса.

Уже в течение первых двух минут после заражения в инфицированной бактерии синтезируется до 25 ферментов, большая часть которых является новыми, не встречающимися в незараженной клетке. Одним из них является фермент, способный катализировать синтез новых молекул нуклеиновых кислот из рибонуклеозидтрифосфатов, используя в качестве матрицы вирусную РНК. Этот фермент до настоящего времени не имеет единого названия. Различные группы авторов предлагают самые разнообразные названия: РНК-синтетаза [38], РНК-репликаза [16], вирусная РНК-полимераза [32], РНК зависимая РНК-полимераза [14] и т. д.

Вирусная РНК-полимераза была впервые описана Балтимором и Франклином [5], которые обнаружили ее в клетках, инфицированных вирусом Менго. С этого времени появилось большое количество сообщений об обнаружении этого фермента в клетках, инфицированных РНК-содержащими вирусами [4, 13, 18, 23, 30, 31, 34].

Необходимо отметить, что в последние годы появились сообщения, указывающие на обнаружение внутри ряда вирионов ферментов, катализирующих синтез ДНК и РНК на родительской матрице. Так, например, РНК-полимераза была обнаружена в составе вирионов вируса везикулярного стоматита [2], а также различных представителей миксовирусов: вируса болезни Ньюкасла [19], разных штаммов вируса гриппа [12, 27] и ряда других. Однако, как нам кажется, катализирующая способность этих ферментов не должна исключать синтез аналогичного фермента в клетке после ее инфицирования вирусами, а тем более действия этих *de novo* синтезированных ферментов.

По-видимому, наличие вирионных полимераз является общей закономерностью для большинства сложно устроенных вирусов с внешней липопротеидной оболочкой, хотя пока в составе такой большой группы РНК-содержащих вирусов, как арбовирусы, этот фермент не обнаружен. Предполагается, что отсутствие инфекционных свойств у РНК вирусов с собственной полимеразой связано с потерей фермента в процессе экстракции. Нужно сказать, что такой же фермент ДНК за-

зависимая ДНК-полимераза имеется и в составе ДНК-содержащего вируса осповакцины.

После всего сказанного представляется интересным рассмотреть некоторые предполагаемые механизмы, осуществляющие репликацию вирусных нуклеиновых кислот в зараженных клетках и некоторые физико-химические свойства последних. Во всех доступных изучению системах как *in vivo*, так и *in vitro* синтез вирусной РНК приводит к тому, что образовавшаяся дочерняя РНК имеет точно такой же нуклеотидный состав, что и родительская РНК. Это говорит о том, что после синтеза «минус» спиралей в последующем должна транскрибироваться «минус» спираль с тем, чтобы образовалась комплементарная к ней новая РНК «плюс» спираль, т. е. дочерняя вирусная РНК. При этом в системе, обеспечивающей синтез вирусных РНК, не происходит накопления свободных «минус» спиралей, последние не входят также и в состав зрелых вирионов. Иначе говоря, фермент, синтезирующий дочернюю РНК, транскрибирует только «минус» спираль двухспирального комплекса. Что же касается «плюс» спирали, то она в этом случае либо не транскрибируется, либо ее комплементарные копии «минус» спирали, освобождаясь из комплекса, сразу же разрушаются. Однако последнее предположение о разрушении «минус» спиралей, по-видимому, неприемлемо, так как оно предполагает наличие специальной и в высшей степени специфической системы, обеспечивающей осуществление этого процесса. По-видимому, синтез «минус» спиралей идет медленнее, чем синтез «плюс» спиралей. Такой синтез, при котором образуется преимущественное количество одного из компонентов, получил название «асимметрического» синтеза.

Механизм, обеспечивающий асимметрию синтеза вирусной РНК, до настоящего времени не раскрыт, а существующие предположения указывают на возможность способности фермента копировать матричную «минус» спираль лишь в одном направлении и с одного конца.

До последнего времени указывалось в основном на три возможных механизма репликации вирусных РНК. При одном из них, полуконсервативном механизме репликации, биосинтез вирусных РНК осуществляется следующим образом: фермент (РНК-зависимая РНК-полимераза), ответственный за синтез РНК на матрице вирусной РНК, синтезирует новые дочерние вирусные «плюс» спирали, которые по мере синтеза вытесняют из двухспирального комплекса предыдущую родительскую «плюс» спираль, в результате чего в течение всего биосинтеза вирусной РНК происходит замена одной «плюс» спирали другой при сохранении «минус» спирали. Исходя из другого представления о механизме репликации (консервативный механизм), предполагается, что синтез дочерних РНК происходит при интактном двухспиральном комплексе, а вновь синтезированная РНК, хотя и комплементарна «минус» спирали, однако не вытесняет из комплекса родительскую «плюс» спираль.

Как видно из сказанного, как в случае полуконсервативного, так и в случае консервативного механизмов, процесс синтеза вирусных РНК

представляется двухэтапным. И в том и в другом случае синтез начинается образованием при помощи РНК-полимеразы комплементарной «минус» спирали, и первый этап завершается формированием двухспирального комплекса, получившего название репликативной формы РНК.

Впервые репликативная форма РНК (РФ) была обнаружена Монтанье и Сандерсом [25] в клетках, инфицированных вирусом энцефаломиокардита. Авторы показали, что при заражении асцитных клеток Кребс II в них накапливается РНК, заметно отличающаяся своими свойствами как от родительской вирусной, так и от клеточной РНК. На основании того, что двухспиральная РНК содержит «минус» нить, которая может служить матрицей для синтеза вирусной РНК, авторы назвали ее репликативной формой РНК по аналогии с репликативной формой ДНК. Этот вид РНК имеет меньшую константу седиментации, меньшую плотность при центрифугировании в градиенте плотности сернокислого цезия и отличается по поведению на колонках с метилированным альбумином. Кроме того, оказалось, что она устойчива к действию панкреатической рибонуклеазы и имеет кривые плавления с характерным подъемом оптической плотности при достаточно высокой температуре.

Еще один механизм репликации вирусных РНК был предложен Броуном и Мартином [10]. Согласно этой гипотезе, «минус» спираль после завершения ее синтеза на матрице родительской РНК образует кольцо. Синтез дочерних «плюс» спиралей также происходит по кругу, причем вновь синтезированная «плюс» РНК представляет собой продолжающуюся спираль РНК большой длины, от которой каким-то особым ферментом как бы откусываются нужные кусочки вирусной РНК, входящие в дальнейшем в состав вирусов. Однако эта гипотеза не имеет пока достаточных экспериментальных подтверждений и не получила широкого признания.

Все вышесказанное, к сожалению, не дает оснований сделать какое-либо определенное заключение о механизме репликации вирусной РНК. Справедливости ради надо отметить, что в последнее время все большее число исследователей отдают предпочтение полуконсервативному механизму репликации [6, 17, 22].

Несмотря на определенные неясности в вопросе репликации вирусных РНК, тем не менее наблюдаются какие-то общие моменты во всех трех указанных механизмах. Это видно на примере описанного выше обстоятельства, указывающего на однородность первого этапа репликации с участием фермента и образованием новой репликативной формы РНК, и в этом смысле изучение этого вопроса приобретает относительно «спокойное» течение. Однако в качестве «возмутителя спокойствия» выступил американский ученый Г. Темин [37], показав на примере РНК-содержащих онкогенных вирусов (онкорнавирусов) совсем иной механизм репликации вирусных РНК. Базируясь на обнаруженной им чувствительности репродукции онкогенных вирусов, имеющих в своем составе РНК, к действию актиномина Д, он предположил участие в синтезе

вирусной РНК какой-то новой ДНК. Выполненные автором в дальнейшем эксперименты показали, что синтез РНК-содержащего вируса саркомы Рауса осуществляется в отличие от многих РНК-содержащих вирусов при помощи вновь синтезированной промежуточной формы ДНК. Эта так называемая ДНК-провирусная теория была подтверждена дальнейшими экспериментами, в которых было показано, что применение ингибиторов синтеза ДНК (аметоптерин, флюордезоксинуридин, цитозин арабинозид) сразу же после инфицирования клеток вирусом саркомы Рауса предохраняет клетки от инфекции. Все эти факты убедительно продемонстрировали необходимость синтеза новой ДНК на матрице вирусной РНК. Это обстоятельство, идущее вразрез с центральной догмой Ф. Крика, обусловило предположение о существовании какого-то нового уникального фермента, способного осуществлять такую необычную транскрипцию. Такая транскрипция получила название *обратной*, а сам фермент, обнаруженный в составе вириона саркомы Рауса, — РНК зависимой ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы. Однако вскоре аналогичный фермент был обнаружен в составе двух других неонкогенных вирусов (вирус Висна и пенящийся вирус приматов). Этот факт показал, что феномен обратной транскриптазы не является достоянием одних лишь онкорнавирусов.

Далее представляется целесообразным рассмотреть механизм, посредством которого осуществляется синтез вирусных ДНК в зараженной клетке. Можно считать, что определенных отличий в синтезе вирусных и клеточных ДНК не имеется. Если рассматривать синтез вирусной ДНК в соответствии с схемой Уотсона и Крика, то после одного цикла репликации ДНК каждая состоящая из двойной спирали ДНК должна содержать по одной вновь образовавшейся и одной родительской цепи. Репликативный механизм синтеза представляется полуконсервативным, т. е. составляющие вирусную ДНК спирали постепенно расходятся, и на каждой из них синтезируется комплементарная спираль.

Синтез вирусной ДНК осуществляется при участии фермента ДНК-полимеразы. Достаточно полно этот процесс изучен в клетках инфицированных вирусом осповакцины. В этом случае, в отличие от синтеза клеточных ДНК, он происходит в цитоплазме инфицированных клеток и нуждается в образовании в зараженной клетке ДНК-полимеразы, синтез которой ингибируется пуомицином или другими белковыми ингибиторами. Кроме того, в инфицированных клетках обнаруживается также тимидинкиназа, обеспечивающая синтез тимидинфосфата. Нужно сказать, что синтезированная *de novo* ДНК-полимераза и тимидинкиназа отличаются от аналогичных ферментов незараженных клеток рядом свойств.

Как уже указывалось выше, в составе некоторых РНК-содержащих вирусов обнаружен фермент, ответственный за синтез вирусных РНК, по аналогии с ним в составе вируса осповакцины была найдена ДНК-полимераза [21]. Авторы придают большое значение этому факту в связи с тем, что ДНК-содержащий вирус осповакцины репродуцируется в

цитоплазме, где такой фермент отсутствует (в незараженных клетках ДНК-полимераза находится в ядре).

В настоящее время трудно сказать, существуют ли какие-либо механизмы, регулирующие судьбу молекулы вирусной РНК в зараженной клетке, будет ли эта РНК использована в качестве матрицы для синтеза комплементарной РНК, или же она выполнит роль информационной РНК в рибосомах, или же наконец войдет в состав вириона. Вероятнее всего судьба молекулы РНК зависит от того, с каким компонентом она столкнется: с РНК-полимеразой (синтез «минус» нитей), с рибосомой (синтез вирусных белков) или же с белковыми предшественниками вирусной частицы. На разных стадиях вирусной инфекции концентрация этих структур меняется и соответственно изменяется вероятность столкновений.

Относительно же регуляции синтеза вирусных ДНК нужно сказать, что в этом случае мы сталкиваемся с еще менее изученной проблемой. Скорость синтеза ДНК зависит от большого количества факторов: наличия субстратов, количества доступных матриц, количества и активности ферментов, принимающих участие в репликации ее и т. д.

Как уже указывалось выше, в процессе синтеза вирусной РНК в инфицированных клетках происходит формирование новых видов РНК, отсутствующих в незараженных клетках. Они отличаются друг от друга как физико-химическими параметрами (коэффициент седиментации, плавучая плотность, нуклеотидный состав, молекулярный вес), так и своим отношением к действию рибонуклеазы и проявлением инфекционной активности. Наиболее полно свойства этих вновь синтезированных РНК изучены у арбовирусов и пикорнавирусов.

Так, на примере арбовирусов было показано, что в клетках, инфицированных этими вирусами, синтезируются в основном три вида вирус-специфических РНК с константами седиментации 37—45S (единиц Сведберга), 26S и 20—22S [11, 20, 33, 35, 39]. Первая из них, наиболее тяжелая, обладает инфекционностью, чувствительна к действию РНК-азы и имеет константу седиментации и нуклеотидный состав, а также молекулярный вес, сходные с вирионной РНК, т. е. по всем своим признакам идентична родительской РНК. Второй вид РНК с коэффициентом седиментации 26S чувствителен к действию РНК-азы, отличается своим поведением при электрофорезе в полиакриламидном геле. Но вопрос об инфекционности этой формы РНК пока еще остается открытым, хотя в последнее время появилось небольшое число сообщений, указывающих на выявление ее инфекционных свойств [6, 7].

По мнению ряда исследователей, вирусная РНК может существовать в двух конформациях, различно седиментирующих в градиенте сахарозы, 40S и 26S, или же вирусный геном может содержать крайне лабильную к прогреванию часть, после разрыва которой РНК легко разрушается на две части. Эти выводы были сделаны на основании данных, полученных при переводе вирионной 40S РНК в 26S форму [15, 36]. Что же касается функции 26S РНК, ее роли в процессе синтеза вирусных

РНК, то в последнее время большинство исследователей склонны рассматривать ее как репликативную промежуточную форму РНК (РПФ), являющуюся предшественником вирусной РНК.

И наконец, третий вид РНК, обычно выявляемый в клетках, инфицированных арбовирусами,— это РНК с константой седиментации 20—22S. В отличие от первых двух видов она резистентна к действию РНК-азы и состоит из двух нитей («плюс» и «минус»), т. е. является репликативной формой РНК, служащей матрицей для дальнейшего синтеза дочерних «плюс» спиралей.

Почти такие же значения констант седиментации и других параметров выявлены для многих рибонуклеиновых кислот РНК-содержащих вирусов; ящура [3], везикулярного стоматита [26], энцефаломенингита [33] полиовируса [1] и других. Около четырех видов РНК с константами седиментации 57S, 35S, 18S, и 16S выявлено у вируса болезни Ньюкасла [8]. Еще более тяжелая РНК (65—70S) обнаружена почти у всех онкорнавирусов [29].

В связи с тем, что в последнее время в составе вирусных РНК-содержащих вирусов все чаще обнаруживается фермент, ответственный за синтез РНК на матрице РНК, можно предположить, что первым процессом, индуцированным вирусом в зараженной клетке, является транскрипция родительской РНК с помощью вирусной РНК-полимеразы (транскриптазы) с образованием двунитчатых и многонитчатых структур [7, 9]. Эти двунитчатые и многонитчатые формы получили название транскриптивных промежуточных форм [28]. В то же время *de novo* синтезированная РНК-зависимая РНК-полимераза осуществляет, вероятно, синтез однонитчатой дочерней РНК на матрице указанных выше двунитчатых и многонитчатых структур.

Как видно из сказанного выше, еще многое в процессе биосинтеза вирусных нуклеиновых кислот остается неясным: участвует ли на более поздних стадиях транскрипции родительской матрицы вновь синтезированная РНК-полимераза, какова природа фактора, ответственного за раскручивание нитей ДНК, и еще множество вопросов, имеющих как теоретическое, так и практическое значение, которые в настоящее время не выяснены и ждут своего разрешения.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 17.V 1972 г.

Ա. Ս. ԱՂԱԹԱՅԱՆ

ՎԻՐՈՒՍԱՅԻՆ ՆՈՒԿԼԵԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԸ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Վերջին ժամանակներս ուսումնասիրության նյութ է դարձել ՌՆԹ և ԴՆԹ պարունակվող վիրուսների սեպտիկացիայի մեխանիզմները, վիրուսային ՌՆԹ-ի և ԴՆԹ-ի սինթեզման կարգավորման հետ կապված հարցերը, ինչպես նաև վիրուսային նուկլեինաթթուների տարբերությունը բջջայինից և այլն:

Աշխատանքում քննարկվում են օնկովիրուսների ռեպրոդուկցիայի առանձնահատկությունները, ինչպես նաև՝ վիրուսային և de novo սինթեզվող ՌՆԹ-ի պոլիմերազայի և հակադարձ տրանսկրիպտազայի ֆունկցիաները, ուսումնասիրվել են վիրուսասպեցիֆիկ ՌՆԹ-ի սինթեզը այն բջիջների վրա, որոնք վարակված են ՌՆԹ պարունակող վիրուսներով, և նրանց դերը վիրուսների ռեպրոդուկցիայի հարցերում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Baltimore D. IX Междунар. конгр. по микробиол. 366—373 (Москва), 1966.
2. Aaslestad H., Clark H., Bishop D., Koprowski H. J. Virol., 7, 726—735, 1971.
3. Arllinghaus R., Polatnick J., Vande Woude G. Virology, 30, 541—550, 1966.
4. Baltimore D. Proc Natl. Acad. Sci, 51, 450—460, 1964.
5. Baltimore D. and Franklin R. J. Biol. Chem., 238, 3395—3400, 1963.
6. Bishop J., Koch G. Virology, 37, 521—534, 1969.
7. Bishop J. J. Virol., 7, 486, 1971.
8. Bratt M. J. Virol., 38, 485—488, 1969.
9. Bratt M. Цит. по «Вопр. вирусол.», 1, 125, 1972.
10. Brown and Martin. Nature, 208, 861—864, 1965.
11. Cartwright K., Burke D. J. Gen. Virol., 231—248, 1970.
12. Chow, Simpson. Proc. Natl. Acad. Sci., 68, 752, 1971.
13. Cline M., Eason R., Smellil R. J. Biol. Chem., 238, 1788—1792, 1963.
14. Dalgarno L., Martin E. Virology, 26, 450—465, 1965.
15. Dobos P., Faulkner P. J. Virol., 4, 429—438, 1969.
16. Flike M., Ehrstionsen E., Zahelle O. Biochem. et Biophys. Res. Comm, 18, 288, 1965.
17. Franke B., Hofschneider. J. Mol. Biol., 40, 45—63, 1969.
18. Horton E., Lim S., Dalgarno L., Martin E., Work T. Nature, 204, 247—250, 1964.
19. Huang A., Baltimore D., Bratt M. J. Virol., 7, 389—400, 1971.
20. Jgarashi A., Fukuoka T., Nlthiuthai P. Biken J. 10, 195—202, 1967.
21. Kates J., Mc Ayslan B. Proc. Natl. Acad. Sci. 58, 134—139, 1967.
22. Martin E. Brit. Med. Bull., 23, 192—197, 1967.
23. Martin E. Virology, 39, 107—117, 1969.
24. Martin E. and Sonnabend J. J. Virol., 1, 97—109, 1967.
25. Montagnier and Sanders P. Nature. 199, 664—666, 1963.
26. Newman and Brown. J. Gen. Virol., 5, 305—313. 1969.
27. Penhoet., Miller., Doyle. Blattl Proc. Natl. Acad. Sci., 68, 1369, 1971.
28. Porter et al. II-ой вирусологический конгресс, Будапешт, 1971.
29. Robinson W., Pitkanen A., Rubin H. Proc. Natl Acad. Sci, 54, 1273—1281, 1965.
30. Scholtissek C. Biochem. et Biophys Acta., 179, 389—397, 1969.
31. Scholtissek C., Rott R. J. Gen. Virol., 4, 565—570, 1969.
32. Shapiro L., August S. J. Mol. Biol., 11, 272—284, 1965.
33. Sonnabend J., Martin E., Mees E. Nature, 213, 365—367, 1967.
34. Sreevalsan T., Fay H. Virol., 3, 599—604, 1969.
35. Sreevalsan T., Lockart R. Proc. Natl. Acad. Sci., 974—978, 1966.
36. Sreevalsan T., Lockart R., Dodson M., Hartman K. J. Virol., 558—566, 1968.
37. Temin H., Mlsutani I. Nature. 226, 211—213, 1970.
38. Weissman C., Simon L., Ochoa S. Proc. Natl. Acad. Sci., 49, 407—414, 1963.
39. Zebovltz E., Brown A. J. Mol. Biol., 50, 185—198, 1970.