

ОНКОГЕН V-SRC: ТРАНСКРИПЦИЯ И ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Н.С. АМБАРЦУМЯН*, Н.Г. НАЛБАНДЯН*, А.Г. ТАТОСЯН**, Ж.И. АКОПЯН*

*Институт молекулярной биологии НАН РА, 375044, Ереван

**Онкологический научный центр АМН РФ, 115478, Москва

В клетках *Escherichia coli*, несущих рекомбинантные плазмиды pPrC11 и psrcC с фрагментами генома вируса саркомы Рауса, наблюдается эффективная транскрипция вирусспецифических последовательностей. Анализ транскриптов выявил несколько классов РНК, один из которых считается со структурой части гена src вируса саркомы Рауса.

Escherichia coli-ի քիչքներում, որոնք կրում են pPrC11 և psrcC պլազմիդները Ռաուսի սարկոմայի վիրուսի գենոմի ֆրագմենտներով, նկատվում է վիրուսահատկանշական հարողականությունների արդյունավետ տրանսկրիպցիա: Տրանսկրիպտորների անալիզը բացահայտեց մի քանի դասի ՌևԹ-ներ, որոնցից մեկը կարողացվում է Ռաուսի սարկոմայի վիրուսի src գենի կառուցվածքային հատվածից:

Effective transcription of virus-specific sequences was shown in *Escherichia coli* cells that carry recombinant plasmids pPrC11 and psrcC with fragments of the Rous sarcoma virus (RSV) genome. Analysis of transcripts revealed several classes of RNA, one of which is probably transcribed from the structural part of the RSV src gene.

Вирус саркомы Рауса - онкоген src - рекомбинантная плазида - тирозинспецифическая фосфопротеинкиназа

В последние годы решение проблемы онкогенеза рассматривается как один из основных вопросов биологии. В настоящее время интенсивные исследования, проведенные в целом ряде лабораторий мира, привели к формированию основной концепции о механизмах неопластической трансформации клеток.

В основу этой концепции легло представление об онкогенах-мутировавших вариантах нормальных генов (протоонкогенов), ответственных за процессы пролиферации и дифференцировки клеток.

Внимание исследователей сосредоточено на решении проблемы выявления функций этих онкобелков в клетке и на том, каким образом функционирование этих белков приводит к необратимым изменениям-раковому перерождению.

В свете вышеизложенного перспективным представляется поиск упрощенных модельных систем для изучения функций различных онкогенов.

В настоящей работе такой модельной системой служили клетки *Escherichia coli*, несущие плазмиды pPrC11 и psrcC [1], полученные ранее в нашей лаборатории.

Геном вируса саркомы Рауса (RSV) состоит из четырех генов: gag, pol, env и src [4]. Трансформирующий потенциал вируса обусловлен экспрессией гена src, кодирующего фосфобелок pp60^{src}. Онкобелок pp60^{src} обладает фосфопротеинкиназной активностью и специфически фосфорилирует тирозин в белках-субстратах [3].

На рис.1 представлена структура плазмид рPrC11 и psrcC, использованных в работе. Плазмида рPrC11 представляет собой рBR322, в которую по участку HindIII встроены фрагменты генома RSV длиной 6 т.н.п. В состав рPrC11 входят интактные гены gag и src, 2 копии LTR, 5' область гена pol и 3'-область гена env. Плазмида psrcC представляет собой субклон рPrC11, содержащий интактный ген src, 3'- область гена env и С-нетранслируемую область RSV.

Материал и методика. В работе использовали штаммы *E.coli* HB101, несущие плазмиды рPrC11 и psrcC (1).

РНК из клеток *E.coli* выделяли с помощью гуанидинизотиоционата [2], разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле, затем переносили на нитроцеллюлозные фильтры и гибридизовали по методу Томаса [12]. В отдельных случаях пробу РНК предварительно подвергали обработке РНКазой I и ДНКазой I.

[³²P]кДНК RSV синтезировали в реконструированной ревертазной реакции с помощью фермента из вируса миелобластома птиц и статистической затравки ДНК по методу, описанному ранее [11]. В качестве матрицы использовали 70S РНК RSV, синтезированный продукт подвергали щелочному гидролизу и гель-фильтрации на сефадексе G50 "Fine". Удельная активность пробы составляла (2-4)х10⁸ имп/мин на мкг.

Синтез [³²P] ДНК рBR322 проводили по методу ник-трансляции [8].

Удельная активность проб составляла 2.10⁸ имп/мин на 1мкг.

Фосфопротеинкиназную активность определяли по методу, подробно описанному ранее [8].

В работе использовали [³²P]дезокситрифосфаты (2000-3000 Ки/ ммоль) фирмы "Amersham", ревертазу, смесь ферментов для ник-трансляции фирмы "Amersham", ДНКазу I фирмы "Wortington" (США).

Результаты и обсуждение. Ранее нами был обнаружен высокий уровень транскрипции вирусспецифических последовательностей в клетках *E.coli*, несущих плазмиду рPrC11 [3]. Высокий уровень гибридизации (60%) меченой пробы с РНК *E.coli*, несущей рPrC11, соответствует процентному содержанию последовательностей RSV, включенных в структуру рPrC11, от общей длины генома вируса. Следовательно, можно предположить, что практически все последовательности RSV, клонированные в рPrC11, эффективно транскрибируются в бактериальных клетках. Этот вывод относится также и к онкогену src, входящему в состав рPrC11.

При рассмотрении структуры и направления транскрипции генов, входящих в состав рPrC11 (рис.1), обнаруживается, что синтез РНК гена src в этом клоне маловероятен. Если инициация транскрипции в этой плазмиде происходит с последовательностей LTR RSV, которые имеют

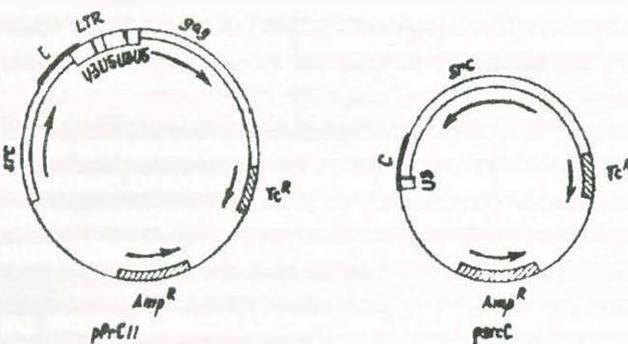


Рис.1. Структура плазмид, несущих фрагменты генома RSV-рPrC11 и psrcC. Стрелками указано направление транскрипции генов, входящих в состав плазмид.

сходство с бактериальными промоторами, то для считывания РНК *src* необходимо сквозное считывание всей плазмиды. Транскрипция гена *src* не может инициироваться также и с последовательностей рBR322, так как ген *Amp^r*, примыкающий к участку *src*, имеет противоположное направление транскрипции (рис.1). Альтернатива заключается в постулировании возможности существования в участке, прилегающем к структурной части гена *src*, последовательностей, способных инициировать считывание РНК в бактериальных клетках. Но тогда в клетках *E.coli* должна транскрибироваться и плазида *psrcC*, которая содержит ген *src* и межгенное пространство между генами *src* и *env*. Кроме того, участок U3 LTR в этой плазмиде не содержит последовательностей, гомологичных бактериальному промотору и описанных ранее. Для проверки предположения о независимой транскрипции гена *src* RSV в *E.coli* мы провели анализ вирусспецифических РНК, синтезируемых в *E.coli*, несущих плазмиды рPrC11 и *psrcC*.

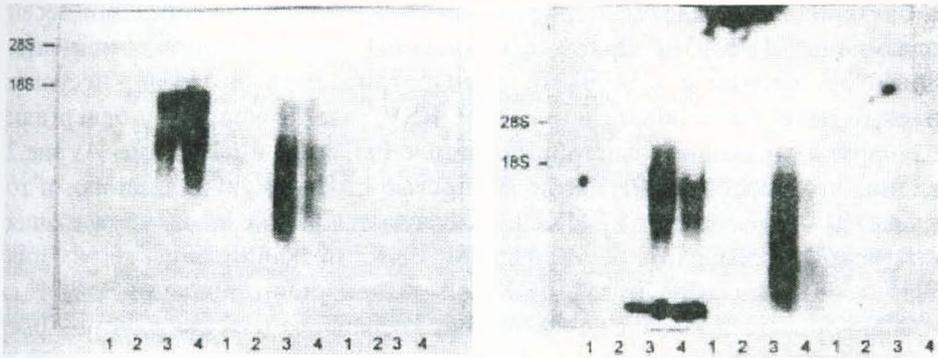


Рис.2. Гибридизация препаратов РНК, выделенных из клеток *E.coli*, несущих рPrC11 и *psrcC*, с [³²P]кДНК RSV (а) и [³²P]кДНК рBR322 (б): 1-крысиные клетки TWERC, трансформированные RSV; 2-*E.coli* HB101; 3-*E.coli* HB101, несущая *psrcC*; 4-*E.coli* HB101, несущая рPrC11.

На рис.2 представлены данные по блот-гибридизации кДНК RSV с РНК из клеток *E.coli*, несущих плазмиды рPrC11 и *psrcC*. В обоих препаратах выявляются молекулы длиной 2,2 тыс. нуклеотидов (т.н.), которые соответствуют по длине *src*-специфическому транскрипту, синтезируемому в клетках, трансформированных RSV [10]. Обнаружены также и другие классы РНК, гибридирующие с кДНК RSV. В клетках *E.coli*, несущих рPrC11, они имеют размер 4 т.н. и 1,4-1,6 т.н.. В клетках *E.coli*, несущих *psrcC* 3,3 т.н. и 1,4-1,6 т.н. РНК, выделенная из клеток *E.coli* HB101, не гибридируется с кДНК (рис.2а). При использовании этого фильтра в гибридации с [³²P]кДНК рBR322 в бактериях, несущих рPrC11, обнаруживается РНК длиной 1,5 т.н., а в клетках, несущих *psrcC*, обнаруживается более гетерогенная популяция РНК длиной 2,2-1,2 т.н. (рис.2,б).

Таким образом, в клетках, несущих как рPrC11, так и *psrcC*, **выявляется гомогенная популяция вирусспецифических РНК** длиной 2,2 т.н.; видимо, эта РНК представляет собой независимый транскрипт *src*-области генома RSV.

Гетерогенность популяции РНК, выявляемая при гибридизации препарата бактерий, несущих *psrcC*, с *pBR322* может быть объяснена возможностью непрерывного считывания РНК в направлении *src-Amp^R*, так как терминирующие транскрипцию последовательности LTR RSV в данной плазмиде отсутствуют. Это предположение подтверждается также тем, что гены *src* и *Amp^R* в составе *psrcC* находятся в одинаковой ориентации (рис.1). Природа других RSV- специфических РНК, не совпадающих с известным транскриптом гена *src*, неясна. Вопрос этот требует дополнительного исследования, не исключено, что они являются результатом неспецифической инициации транскрипции или сквозного считывания генов в плазмиде.

Гомогенная РНК, длиной 1,5 т.н., гибридизующаяся с пробой *pBR322*, является продуктом экспрессии плазмидного гена *Amp^R*.

В параллельных экспериментах использованные препараты РНК были проверены на наличие примесей ДНК плазмид, реплицирующихся в бактериальной клетке. Присутствие даже незначительных примесей плазмидных ДНК в препаратах отразилось бы на результатах эксперимента. Поэтому, наряду с обычными препаратами РНК из *E.coli*, несущих плазмиды с последовательностями RSV, электрофорезу подвергали препараты, предварительно обработанные РНКазой и ДНКазой. Из рис.2 видно, что обработка РНКазой полностью снимает гибридизацию, в то время как после обработки ДНКазой наблюдается интенсивная гибридизация полученных препаратов бактериальной РНК. Незначительная деградация РНК в опытах с обработкой ДНКазой объясняется примесями РНКазы, обычно присутствующей в коммерческих препаратах ДНКазы. Контрольные опыты указывают на то, что гибридизация RSV-пробы осуществляется с РНК, экспрессируемой в бактериях, несущих рекомбинантные плазмиды, содержащие фрагменты генома RSV.

Таким образом, доказано существование независимого транскрипта гена *src* в бактериальных клетках, несущих плазмиды с фрагментами генома RSV. В связи с этим можно предположить, что в зоне, прилежащей к структурной части гена *src*, могут находиться последовательности, имеющие сходство с известными бактериальными промоторами, которые могут инициировать транскрипцию гена *src*. Анализ первичной структуры участка, примыкающего к гену с 5' -конца, показал, что подобная последовательность локализована в зоне несовершенного прямого повтора *dr2* и отстоит от начала транскрипции гена *src* на 6 нуклеотидов [10]. Сравнение первичной структуры в этой зоне проводилось с промотором бактериальной природы, определенным ранее [9]. Аналогичный участок был выявлен ранее и в LTR провируса RSV (рис.3).

Область *dr2* RSV, в структуре которой найдена гомология с бактериальным промотором, представляет собой несовершенный прямой повтор, локализованный слева и справа от гена *src*, причем в последнем случае эта зона непосредственно прилегает к началу U3-области LTR RSV и продолжается внутрь U3, охватывая инвертированный повтор на конце

U3 LTR (рис.3). Обнаруженный ранее участок, имеющий сходство с промотором бактерий, локализован на противоположном конце U3-области LTR и прилегает к R-зоне LTR, при этом он занимает область сигнала полиаденилирования (рис.3.A). Сопоставление структуры участков RSV, обладающих потенциальными промоторными свойствами в *E.coli*, показывает, что фрагмент, выявленный в данной работе, не уступает локусу, описанному ранее, по сходству с прототипным бактериальным промотором.

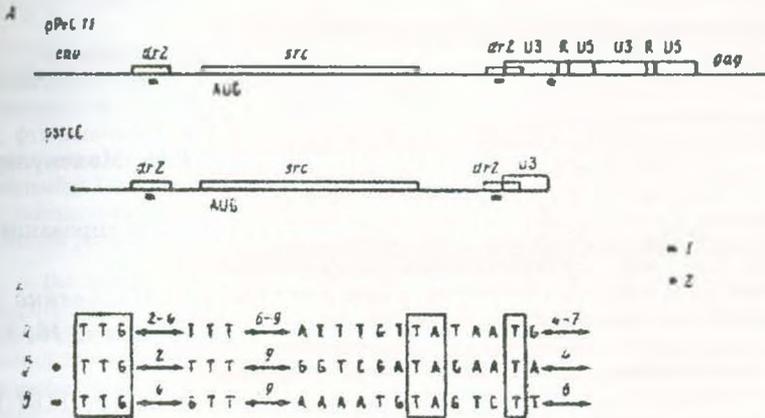


Рис.3. Схема расположения промоторных последовательностей в клонах pPrC11 и psrcC (A) и сравнение структур потенциальных бактериальных промоторов (Б). 1-зона гомологии с бактериальным промотором, выявленная в работе; 2-зона гомологии с бактериальным промотором, выявленная ранее; а-первичная структура прототипного бактериального промотора; б-первичная структура промотора выявленная ранее; в-первичная структура промотора выявленная в работе. В прямоугольники заключены наиболее консервативные последовательности.

Ранее нами была обнаружена тирозинспецифическая фосфопротеинкиназная активность белкового продукта гена src RSV -pp60^{src} в клетках *E.coli*, несущих плазмиду pPrC11. Для подтверждения правильности сделанных выводов мы провели анализ клонов, несущих плазмиду psrcC, на наличие аналогичной активности. Определение фосфопротеинкиназной активности проводили по способности белка pp60^{src} фосфорилировать тяжелую цепь иммуноглобулинов кролика. Анализировали несколько независимых клонов *E.coli*, несущих плазмиду pPrC11 и psrcC.

Ниже указано относительное содержание фосфопротеинкиназной активности, определенное из отношения площади пика при сканировании радиоавтографа, к абсолютному содержанию белка в лизатах:

Номер клона	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Отн. активн.	35,2	27,1	17,1	6,25	2,9	1,69	2,6	15,1	2,7	28

Видно, что уровень фосфопротеинкиназной активности в клетках *E.coli*, несущих psrcC, не отличается от такового в клетках, несущих pPrC11, и варьирует в широких пределах в различных клонах.

В целом уровень протеинкиназной активности в клетках *E.coli* непропорционально низок по сравнению с высоким уровнем транскрипции

вируспецифических последовательностей. Видимо, только незначительная часть синтезированной RSV-специфической РНК транслируется в клетках *E.coli*, приводя к образованию функционально активного белка.

Таким образом, из представленных данных следует, что в клетках *E.coli*, несущих плазмиды rPrC11 и rsgcC, происходит эффективная транскрипция вируспецифических последовательностей. Предполагается, что считывание гена *sgc* в бактериальных клетках происходит с потенциального промотора, находящегося в геноме RSV и имеющего сходство с бактериальными промоторами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амбарцумян Н.С., Татосян А.Г., Ениколопов Г.Н. Молекулярная биология. 16, 1183-1187, 1982.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., Мир, 192-193, 1984.
3. Татосян А.Г., Амбарцумян Н.С., Тополь Л.З., Мазуренко Н.Н. Молекулярная генетика и микробиология. Вирусология, 16, 18-22, 1986.
4. Baltimore D. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 39, 1187-1200, 1975.
5. Collett M.S., Erickson R.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2021-2025, 1978.
6. Guntaka R.V., Mitsialis S.A. Gene., 4, 113-121, 1980.
7. Merner B., Malamy M., Coffin J. Mol. Cell. Biol., 3, 1746-1758, 1983.
8. Rigby P. W., Dichmann H., Rhodes C., Berg P. J. Molec. Biol., 113, 237-251, 1977.
9. Rosenberg M., Court D. Annu. Rev. Genet., 13, 319-353, 1979.
10. Schwartz D., Tizard R., Gilbert W. Cell., 32, 853-869.
11. Tatosyan A. G., Topol L. Z., Feinstein E. et. al. Neoplasma, 30, 681-690, 1983.
12. Thomas P.S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5201-5205, 1980.

Поступила 01.XII.2000