



УДК 578.828.112:578.5

В. П. Томсонс, Л. Г. Чернобаева, С. В. Козырева,
В. А. Кобычева, Ю. Ю. Перегудова, М. Ф. Муровска, Л. П. Тихомирова

ЭКСПРЕССИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ РНК В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК С ИНТЕГРИРОВАННЫМ асРНК-ГЕНОМ И ИХ ВОЗМОЖНАЯ КОРРЕЛЯЦИЯ С ПОДАВЛЕНИЕМ РЕПРОДУКЦИИ BLV

Показана экспрессия антисмысловых (ас) по отношению к LTR BLV (район 341—616 п. н.) и гену X BLV (район 6997—7929 п. н.) последовательностей в клонах культуры клеток FLK, персистентно продуцирующих BLV. Выявленная экспрессия ас-последовательностей согласуется со снижением РНК-зависимой ДНК-полимеразной активности, концентрации главного вирусного белка BLV р24 и продукции вирионов.

Введение. С момента обнаружения у бактерий регулирующей роли антисмысловых РНК (асРНК) в экспрессии генов были проведены многочисленные исследования, авторам которых удалось с помощью асРНК изменить (по крайней мере существенно снизить) уровень экспрессии изучаемых генов [1], в том числе и гена *c-myc* [2], подавить в культуре клеток репликацию ряда вирусов, в частности, RSV [3], HIV [4], BLV [5]. В большинстве работ введение ас-полинуклеотидов в клетку-реципиент проводилось одновременно или было чуть сдвинуто по срокам с введением смысловых последовательностей (вирусов, векторов с соответствующими генами). Однако наряду с этим имеются работы, указывающие на возможность ингибирования экспрессии собственных клеточных генов [6, 7]. Нам исследована возможность влияния ас-конструкций на экспрессию вирусных генов в культуре клеток FLK, для которой характерны интеграция и продукция BLV [8].

Материалы и методы. Ас-конструкции к LTR BLV (район 341—616 п. н.; *pBAG*) и гену X BLV (район 6997—7929 п. н.; *pcDSRBx*) получены во ВНИИ с.-х. биотехнологии ВАСХНИЛ [5]. Эти конструкции внесены в клетки FLK, любезно предоставленные Алтанером [9], методом коинфекции с *pSV2neo* [10].

После селекции с применением генетина G-418 и оценки интеграции соответствующих конструкций для дальнейшей работы отобраны клоны № 3 — с *neo*-геном, № 32 — с ас-последовательностями к LTR BLV и № 39 — с ас-последовательностями к гену X BLV.

Продукцию BLV в культурах клеток этих клонов определяли по активности РНК-зависимой ДНК-полимеразы [11], уровню вирусного антигена *p24* методом КРИА [12] и по количеству вирусных частиц в электронном микроскопе на агарозных пластинках [13]. Для оценки указанных параметров использовали вирусосодержащий материал, полученный после концентрирования ростовой среды культур клеток 5—6-го пассажей изучаемых клонов.

Экспрессию вирусспецифических или ас-последовательностей выявляли с помощью метода спот-гибридизации нуклеиновых кислот на нитроцеллюлозных фильтрах [14]. Имобилизованные на фильтре РНК гибридизовали с ³²P-мечеными специфическими зондами. В качестве молекулярных зондов использовали рекомбинантные плазмиды,

© В. П. Томсонс, Л. Г. Чернобаева, С. В. Козырева, В. А. Кобычева, Ю. Ю. Перегудова,
М. Ф. Муровска, Л. П. Тихомирова, 1993

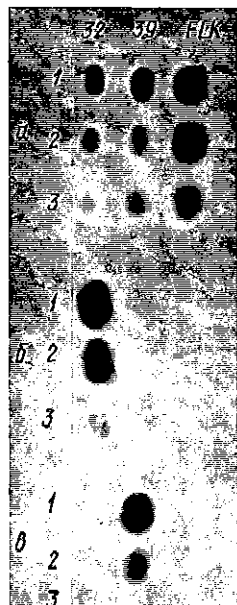
содержащие участки вирусспецифических последовательностей, составляющие полный геном BLV, или соответствующие ас-конструкции.

РНК выделяли фенольно-хлороформным методом из полисом, осажденных 0,1 М MgCl₂ [15], и наносили на нитроцеллюлозные фильтры в количествах, указанных на рисунке.

Результаты и обсуждение. Ранее показано, что ас-последовательности к LTR BLV (район 341—616 п. н.) и гену X BLV (район 6997—7929 п. н.) после трансфекции культуры клеток FLK выявляются в составе геномной ДНК [16]. Такие последовательности заметно влияли на репродукцию BLV в данных персистентно продуцирующих вирус клеток. Возникает вопрос, экспрессируются они или же воздействуют

на геном BLV каким-то иным способом? Не исключено, что сама трансфекция могла бы привести к отбору клеток с измененным уровнем продукции BLV. Как видно из рисунка (а), изучаемые клетки клонов №№ 32 и 39 экспрессируют BLV-специфические РНК, но в меньших количествах, чем исходные клетки FLK. Следовательно, ас-конструкции снижают синтез вирусной РНК.

С помощью спот-гибридизации удалось выявить в составе полисомной РНК ас-последовательности, гомологичные используемым при трансфекции (рисунки б, в). Только в клетках клона № 32 показано присутствие последовательностей, гомологичных ас-конструкции к LTR BLV, и только



Дот-гибридизация РНК, экспрессируемой в клетках BLV-продуцирующей культуры FLK и трансфицированных клонов №№ 32 и 39. Полисомную РНК (1—5; 2—2,5; 3—1,2 мкг) наносили на нитроцеллюлозные фильтры и гибридовали с ³²P-мечеными зондами, комплементарными: а — BLV-геному; б — ас-последовательности к LTR BLV *pBAG*; в — ас-последовательности к гену X BLV *pcDSRBx*

ко в этом клоне обнаружен положительный сигнал при гибридации с ³²P-меченым зондом *pBAG* (рисунк, б). Аналогичные результаты получены в отношении клеток клона № 39, для трансфекции которых использовали ас-конструкции к гену X BLV (рисунк, в).

Характерно, что активность РНК-зависимой ДНК-полимеразы в клетках клонов №№ 32 и 39 снижена на 67 и 24 % соответственно. Уменьшена также продукция внутреннего основного белка BLV *p24* на 70 и 44 % соответственно. То же наблюдается и в случае продукции вирионов (на 92 % для клона № 32 и на 81 % для клона № 39) (таблица), что согласуется с данными спот-гибридизации (рисунк, а), демонстрирующими снижение доли вирусспецифической РНК в составе полисомной РНК. Из приведенных данных следует, что действие ас-

Влияние ас-конструкций на продукцию BLV в клетках клонов FLK

ДНК	Клон	РНК-зависимая ДНК-полимеразная активность*	Концентрация <i>p24</i> BLV, нг/мл	Количество вирионов в 1 мл среды
Контроль	D12	3,6 (100)**	215(100)	6,5 · 10 ⁸ (100)
<i>pSV2neo</i>	№ 3	3,9 (108)	314(146)	7,1 · 10 ⁸ (109)
<i>pBAG + pSV2neo</i>	№ 32	1,2 (33)	65(30)	5,0 · 10 ⁷ (8)
<i>pcDSRBx + pSV2neo</i>	№ 39	2,75(76)	120(56)	1,23 · 10 ⁸ (19)

* Представлена в виде отношения радиоактивности, регистрируемой в полимерном продукте через 1 ч реакции, к таковой, регистрируемой в нулевое время; ** в скобках показано значение соответствующих параметров в процентах по отношению к контролю.

последовательностей специфично, ибо только в клетках с *neo*-геном не обнаружено ингибирования репродукции BLV и даже прослеживается тенденция к ее увеличению (см. таблицу).

Таким образом, последовательности, гомологичные ас-конструкциям к нетранслируемой области LTR BLV в районе 341—616 п. н., где для ретровирусов показано присутствие сайта, ответственного за связывание РНК с рибосомами [17], после трансфекции клеток обнаружены в составе РНК из полисом. Так как именно в этом районе выявлены сайты «кепирования» и «полиаденилирования» РНК BLV [18], можно предположить, что и нарушение трансляции вирусной РНК является результатом взаимодействия вирусной РНК с ас-последовательностями.

Последовательности, гомологичные ас-полинуклеотидам к гену X (район 2997—7929 п. н.), найдены также в составе полисомной РНК. Указанные последовательности выбраны в связи с тем, что ген X ответствен за транскрипцию трансактиваторов, влияющих опосредованно на LTR вируса [19]. В клетках клона № 39 с ас-последовательностями к гену X, как и в случае клона № 32, снижены РНК-зависимая ДНК-полимеразная активность, уровень *p24*, продукция вирионов. Аналогичные данные получены Борисенко и др. [5] при котрансфекции клеток линии СС-81 ДНК провирусного генома BLV и ДНК векторов с ас-фрагментами. В частности, этими же авторами отмечено более эффективное торможение продукции BLV при использовании ас-полинуклеотидов к 5'-нетранслируемому району LTR BLV, чем в случае ас-последовательностей к гену X BLV.

Учитывая, что механизм ингибирующего действия ас-полинуклеотидов всегда связан с формированием двуспиральных участков в информационной РНК вследствие взаимодействия с комплементарной асРНК или асДНК [19], можно заключить, что ингибирование продукции BLV в вируспродуцирующей культуре клеток FLK определяется экспрессией ас-последовательностей к LTR или гену X BLV.

В результате проделанной работы можно сделать следующие выводы.

Показана экспрессия ас-последовательностей к LTR BLV и гену X BLV в клетках клонов FLK.

Установлено, что ас-последовательности снижают количество экспрессируемой РНК BLV в клетках, уменьшают активность РНК-зависимой ДНК-полимеразы, концентрацию главного внутреннего белка BLV *p24* и количество вирионов.

Авторы выражают глубокую благодарность Т. И. Тихоненко и О. И. Мирошниченко за предоставленные ас-конструкции.

Summary. An expression was shown of as-sequences to BLV LTR (region 341—616 n. p.) and to BLV gene X (region 6997—7929 n. p.) in FLK cell culture clones, persistently producing BLV. The detected expression of as-sequences was found to correspond to the decrease of the RNA-dependent DNA-polymerase activity, to the concentration of the major BLV protein *p24* and the production of virions.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власов В. В., Свиначук Ф. П. Антисмысловые РНК // Молекуляр. биология.— 1987.— 21, № 1.— С. 28—32.
2. Wickstrom E. L., Bacon T. A., Gonzales A. Human promyelocytic leukemia HL-60 cell proliferation and *c-myc* protein expression are inhibited by an antisense pentadecanucleotide targeted against *c-myc* RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1988.— 85.— P. 1022—1032.
3. Zemečnic P. C. M., Stephenson M. N. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide // Ibid.— 1978.— 75.— P. 280—284.
4. Goodchild J., Agrawal S., Civera M. P. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus replication antisense oligodeoxynucleotides // Ibid.— 1988.— 85.— P. 5507—5511.

5. Борисенко А. С., Мирошниченко О. И., Аюбян Т. А., Тихоненко Т. И. Ингибирование репродукции вируса лейкоза коров генами РНК в клетках линии СС-81 // Докл. ВАСХНИИ.— 1990.— 8.— С. 41—45.
6. Izant J. G., Weintraub H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNS: a molecular approach to genetic analysis // Cell.— 1984.— 36, N 4.— P. 1007—1015.
7. Jaskulski J. D., de Riel J. K., Mercer W. E. et al. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA Cyclin // Science.— 1988.— 240.— P. 1544—1546.
8. Van der Maaten M. J., Miller J. M. Replication of bovine leukemia virus in mononuclear cell culture // Bull. Haematol.— 1976.— 43.— P. 360—362.
9. Altaner C., Bain I., Zajac V. Isolation and characterization of cell clones producing various amounts of bovine leukosis virus // Folia Biol.— 1985.— 31, N 2.— P. 107—114.
10. Graham F. L., Van der Eb A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // Virology.— 1973.— 52.— P. 456—467.
11. Tomsons V. P., Ivanova S. I., Konicheva V. V. et al. Measuring of reverse transcriptase activity as a method of detecting HTLV-BLV group retroviruses // L. Z. Akademikas Vestis.— 1991.— N 10 (531).— P. 110—114.
12. Коничева В. В., Ильинская Т. Н. Радиоиммунологическое определение основного внутреннего белка вируса лейкоза крупного рогатого скота и антител к нему у домашнего скота // Этнология, диагностика и эпизоотология лейкоза крупного рогатого скота.— Рига: Зинатне, 1982.— С. 45—49.
13. Биндерс У. Т., Мелдрис Я. А., Иванова М. И. и др. Корреляция ревертазной активности с количеством вирусных частиц в препаратах некоторых аденовирусов // Репродукция и биологические свойства онкорнавирусов.— Рига: Зинатне, 1979.— С. 74—81.
14. Cheley B., Anderson R. A reproducible microanalytical method for the detection of specific RNA sequences by dot-blot-hybridization // Anal. Biochem.— 1984.— 137.— P. 15—19.
15. Клеменс М. Выделение эукариотической матричной РНК (мРНК) // Транскрипция и трансляция / Под ред. В. Хеймса, С. Хиггенса.— М.: Мир, 1987.— 264 с.
16. Murovska M. F., Chernobayeva L. G., Miroshnichenko O. I. et al. An investigation of antisense RNA gene effect on BLV reproduction in cell culture // Vet. Microbiol.— 1992.
17. Darlix J.-L. Circularization of retroviral genomic RNA and the control of RNA translation, packaging and reverse transcription // Biochimie.— 1986.— 68.— P. 941—949.
18. Sagata N., Yasunaga T., Tsuzuku-Kawamura J. et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82, N 3.— P. 677—681.
19. Тихоненко Т. И. Антисмысловые полинуклеотиды в качестве антивирусных препаратов. Методы изучения комбинированного действия антивирусных препаратов и иммуномодуляторов при вирусных инфекциях // Междунар. школа молодых ученых.— Рига: Зинатне, 1988.— С. 46—49.

Ин-т микробиологии им. Августа Кирхенштейна
АН Латвии, Рига

Получено 10.12.92