

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl selection at the ribosome // FEBS Lett.— 1982.— 146, N 1.— P. 5—8.
2. Потанов А. П. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов на рибосомах в ходе трансляции // Журн. общ. биологии.— 1985.— 46, № 1.— С. 63—77.
3. McCarthy B. J., Holland J. J. Denaturated DNA as a direct template for *in vitro* protein synthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1965.— 54, N 3.— P. 880—886.
4. The role of template sugar-phosphate backbone in ribosomal decoding mechanism / A. P. Potapov, K. A. Soldatkin, A. P. Soldatkin, A. V. Elskaya // J. Mol. Biol.— 1988.— 203, N 3— P. 885—893.
5. Сазыкин Ю. О. Антибиотики как биохимические реагенты // Биол. химия.— М.: ВИНТИ, 1984.— Т. 20.— С. 111—161.
6. Yarus M. The accuracy of translation // Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.— 1979.— 23.— P. 195—225.
7. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1984.— 436 с.
8. Davis J., Gilbert L., Gorini L. Streptomycin, suppression and the code // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1964.— 51, N 5.— P. 883—890.
9. Молекулярные основы действия антибиотиков / Э. Гэйл, Э. Кандлифф, П. Рейнолдс и др.— М.: Мир, 1975.— 500 с.
10. Неоднозначность трансляции полирибидиловой кислоты транспортными РНК из различных эукариотических объектов / А. П. Солдаткин, Н. И. Желтовская, Г. В. Овчаренко, А. В. Ельская // Укр. биохим. журн.— 1983.— 55, № 6.— С. 603—607.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 10.03.89

STUDIES IN CORRELATION BETWEEN POLY(U) MISREADING AND EFFICIENCY OF POLY(dT) TRANSLATION IN THE CELL-FREE PROTEIN-SYNTHESIZING SYSTEMS OF *E. coli*

I. S. Groisman, A. P. Potapov

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The efficiency of poly(dT) translation and misreading of poly(U) has been studied in cell-free systems from wild-type *E. coli* and streptomycin-resistant mutants with altered ribosome protein *S12*. The data show that there is a positive correlation between poly(U) misreading and efficiency of poly(dT) translation. Conditions promoting misreading of poly(U): an increase in the concentration of neomycin, kanamycin, streptomycin antibiotics, of Mg²⁺ ions stimulate poly(dT) translation as well. A series of antibiotics activities in promotion of both poly(U) misreading and poly(dT) translation is the same: neomycin > kanamycin > streptomycin. The more accurate ribosomes with altered protein *S12* are less efficient in translation of poly(dT). The data obtained are in good agreement with the hypothesis on stereospecific stabilization of codon-anticodon complexes on the ribosome.

УДК 578.828.11:577.212.3

С. В. Шарун, А. П. Коваль, В. М. Кавсан

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 5'- И 3'-НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИРУСА MAV-1

Определены нуклеотидные последовательности 5'- и 3'-концевых участков, а также фрагмента средней части гена обратной транскриптазы (ревертазы) вируса-помощника MAV-1 из комплекса вируса миелобластома птиц. Сиквенированные фрагменты гена обладают высокой степенью гомологии с аналогичными участками генома вируса саркомы Рауса. В последовательности из 507 нуклеотидных остатков обнаружено только 15 зам., из которых шесть приводят к изменению кодируемого аминокислотного остатка.

Наличие остатка аспарагина в позиции 15 соответствует ранее опубликованным данным по определению последовательности аминокислот в белке и делает вероятным предположение, что именно MAV-1 является источником ревертазы в вирусном комплексе, вызывающем миелобластоз у птиц.

Введение. Стандартный сток (BAI strain) вируса миелобластоза птиц (AMV) представляет собой комплекс из трех вирусов: собственно вируса миелобластоза птиц и двух вирусов-помощников MAV-1 и MAV-2. Вирусы-помощники относятся к различным подгруппам: MAV-1 — к подгруппе А, а MAV-2 — к подгруппе В [1—3]. Количество каждого из трех вирусов в комплексе неодинаково: число частиц вирусных-помощников в десять раз больше, чем вируса миелобластоза птиц. Показано, что оба вируса-помощника репликативно компетентны и способны вызывать опухоли у цыплят, однако не трансформируют клетки *in vitro* [2]. Также обнаружено, что при титровании AMV *in vitro* до единичных колоний образуются вирусные псевдочастицы, не имеющие гликопротеидной оболочки и в которых отсутствует ревертазная активность [1, 2].

Дефектность AMV связана с захватом клеточного онкогена *c-myc* и утерей большей части гена *env* [4]. Встраивание онкогена происходит по сайту сплайсинга гена *env*, что приводит к появлению нового сайта сплайсинга, реализация которого вызывает утерю терминирующего триплета в мРНК, кодирующей обратную транскриптазу, и синтезу белка, не обладающего ревертазной активностью [5]. Таким образом, можно предположить, что синтез белковых компонентов оболочки вириона и ревертазы, необходимых для жизненного цикла AMV, происходит на матрице вирусных-помощников.

Вирус миелобластоза накапливается в крови зараженных птиц с высоким титром — до 10^{12} частиц на 1 мл плазмы. Кроме того, активность фермента в вирусных частицах комплекса AMV более чем в двадцать пять раз превышает эту величину в частицах вируса лейкемии Раушера [6]. Эти биологические особенности делают комплекс вируса миелобластоза птиц основным источником препаративного выделения ревертазы [7], одного из важнейших инструментов для генной инженерии.

Однако процесс наработки и очистки фермента в больших количествах ограничивается трудоемким этапом — заражением и содержанием большого количества цыплят для получения вирусосодержащей плазмы. Альтернативным способом производства ревертазы представляется создание генноинженерной конструкции, способной синтезировать белок в количестве, сравнимом с традиционным источником получения фермента.

Для решения в последующем этой задачи осуществлено клонирование гена *pol* вируса-помощника MAV-1, определена нуклеотидная последовательность фрагмента средней части, 3'- и 5'-концов гена *pol*, проведено сравнение их с ранее опубликованными данными по сиквенированию N-концевой последовательности белка [8], а также с нуклеотидной последовательностью 3'-конца гена *pol* вируса-помощника MAV-2 [5] и геном *pol* вируса саркомы Рауса [19].

Материалы и методы. Ген обратной транскриптазы выделен из полного провируса MAV-1, клонированного в составе плазмиды pMAV-1 [10, 11], любезно предоставленной М. Балудой (Джонсоповский центр комплексного исследования рака при Калифорн. ун-те).

Для получения гена и рестриктоного анализа использовали эндонуклеазы *HindIII*, *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *XbaI*, *XhoI* производства НПО «Фермент» (Вильнюс) и *KpnI* — фирмы «BRL» (США), а также нуклеазу S1. Для достройки 3'-концов применяли фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, любезно предоставленный Р. Ш. Бибилашвили (Ин-т эксперим. кардиологии ВКНЦ АМН СССР).

Выделение и очистку ДНК фагов и плазмид, гидролиз ДНК рестриктазами, лигирование фрагментов, поиск рекомбинантных клонов гибридизацией на фильтрах осуществляли по Маниатису и др. [12], а приготовление компетентных клеток — по Хацагану [13].

В качестве зонда для гибридизации использовали фрагмент гена *pol*, вырезанный эндонуклеазой *Bam*HI из плазмиды *pATV-8* [14], которая включает полный провирусный геном вируса саркомы Рауса (*Pr-RSV-C*). Радиоактивно меченный зонд (3×10^8 имп·мин⁻¹·мкг⁻¹) получен с помощью фрагмента Кленова в присутствии α -[³²P]dCTP (ВО «Изотоп», Ташкент, отд-ние) и рассеянной затравки [12].

Нуклеотидную последовательность определяли методом Сэнгера [15, 16] с использованием вектора *M13mp19* и «сиквенирующего» праймера *I7SP* фирмы «New England Biolabs» (США). Для сравнения нуклеотидных последовательностей использовали персональный компьютер Apple IIe с программами DP5A [17] и процессор аминокислотных последовательностей (Р. Шкленникс, Ин-т орг. синтеза АН ЛатССР, Рига). Построение вторичной структуры белков в программе Р. Шкленникса основано на применении метода Чу и Фасмана [18].

Результаты и обсуждение. Ген обратной транскриптазы вируса-помощника *MAV-1* получен путем полного гидролиза плазмиды *pMAV-1* рестриктазой *Eco*RI с последующим лигированием фрагментов в плазмиде *pUC19*, также обработанной *Eco*RI (рис. 1). В результате клонирования в клетках *Escherichia coli* отобраны четыре колонии, давшие положительный сигнал при гибридизации с *pol*-геном вируса саркомы Рауса. При рестриктном анализе рекомбинантных плазмид эндонуклеазами *Eco*RI+*Kpn*I из всех четырех клонов были получены идентичные фрагменты.

Для сиквенирования вставку разрезали эндонуклеазой *Bam*HI на два фрагмента длиной 2000 и 1300 н. п., которые затем субклонировали в фаге *M13*. Меньший фрагмент (5'-конец гена *pol*) дополнительно обрабатывали рестриктазой *Eco*RV, что обеспечивало однонаправленную ориентацию фрагмента при лигировании с вектором *M13mp19*, который после обработки ре-

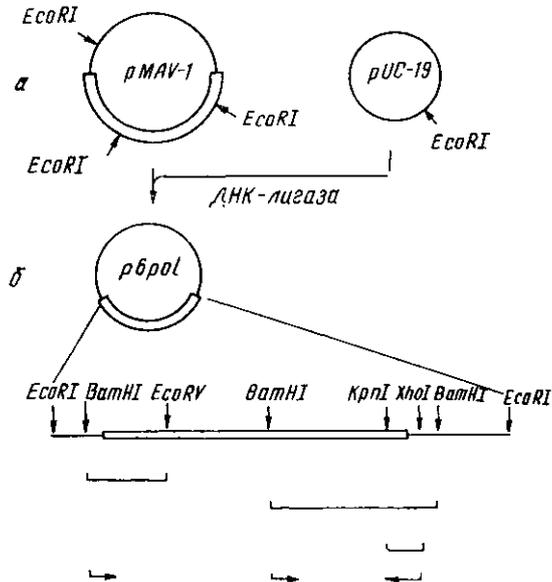


Рис. 1. Схема клонирования гена *pol* вируса-помощника *MAV-1* (а) и рестрикционная карта и стратегия сиквенирования гена (б). Фрагменты гена, клонированные в фаге *M13*, показаны ниже плазмидного клона *pBpol*

Fig. 1. A scheme used for cloning of the *MAV-1 pol* gene (a) and a restriction map and DNA sequence strategy (b). Subcloned fragments in *M13* vectors are indicated below the plasmid clone *pBpol*

стриктазой *Hind*III и достройки выступающих 3'-концов был рестрицирован эндонуклеазой *Bam*HI. Фрагмент длиной 2000 н. п. (средняя и 3'-концевая части гена *pol*) встраивали в *Bam*HI-сайт вектора и нужное положение вставки по отношению к праймеру отбирали отжигом матриц, выделенных из фаговых бляшек, что позволило определить последовательность средней части гена. Для сиквенирования 3'-конца гена *pol* больший фрагмент подвергали гидролизу *Xho*I, обработке нуклеазой S1 и после однократной экстракции фенолом, хлороформом и переосаждения ДНК дополнительно рестрицировали *Kpn*I. Продукты гидролиза разделяли электрофорезом в 0,8 %-ной агарозе и из геля элюировали фрагмент размером 200 н. п., который лигировали с вектором *M13mp18*, рестрицированным *Kpn*I и *Xba*I (сайт *Xba*I обработан нуклеазой S1).

Отличия в последовательности гена *pol* вируса-помощника MAV-1 по сравнению с различными штаммами вируса саркомы Рауса
 Difference between the *pol* gene sequences of MAV-1 and various RSV strains

Номер нуклеотида	Номер аминокислоты	<i>Pr-RSV-C</i>	<i>MAV-1</i>	<i>BH-RSV</i>	<i>BH-RSV</i> (мутант)
2380	—	T	C	C	C
2413	—	A	G	C	C
2431	—	T	C	T	T
2502	—	C	T	C	C
2542	15	G (Asp)	A (Asn)	A	A
3725	408	A (Lys)	G (Arg)	G	G
5092-4	864	ATA (Ile)	GCG (Ala)	ATA	ATA
5105	868	A (Asp)	G (Gly)	A	A
5126	872	G (Gly)	A (Glu)	G	G
5136	—	T	G	T	T
5171	890	T (Leu)	C (Pro)	T	T
5214	—	C	T	C	C

Сравнение нуклеотидных последовательностей *AMV* и линии Брайя вируса саркомы Рауса (линия, дающая высокий титр вируса α -*BH-RSV*) также обнаружило эту замену, сохраняющуюся и у мутанта β -*BH-RSV*, потерявшего способность к продуцированию частиц вируса с высоким титром [20].

Наиболее существенные различия в аминокислотных последовательностях обратных транскриптаз *MAV-1* и *Pr-RSV-C* обнаружены на карбоксильном конце фермента или в пептиде pp32 (его кодируют нуклеотиды с 5054-го по 5252-й). Здесь обнаружено изменение триплета ATA в положении 5092-4, кодирующего Ile у *Pr-RSV-C*, на триплет GCG, кодирующий Ala у *MAV-1*. Изменение третьего нуклеотида в триплетах приводит к замене аминокислотных остатков в положениях 864, 868, 872 и 890. Сумма этих замен выражается в появлении дополнительной α -спирали между 865-м и 876-м аминокислотными остатками, что можно связать с локальным перераспределением зарядов.

Так, Asp (pI 2,77) в 868-м положении ревертазы вируса саркомы Рауса заменен на Gly (pI 5,97) в ревертазе вируса-помощника *MAV-1*, а Glu в 872-м положении изменен на Glu (pI 3,22). Вероятнее всего, такие замены на карбоксильном конце фермента не затрагивают собственно обратнотранскриптазной активности, что не исключает влияния обнаруженных изменений на эндонуклеазную активность пептида pp32.

Тем не менее полученные результаты свидетельствуют о большом сходстве генов, кодирующих обратные транскриптазы в вирусе-помощнике *MAV-1* и вирусе саркомы Рауса. Это сходство сохраняется и на уровне белковой молекулы — гомология сиквенированных областей составляет 94,6%. Скорее всего, в отличие от белка, кодируемого геном *pol AMV*, обратная транскриптаза *MAV-1* является функционирующим ферментом. Это предположение подтверждается и данными других авторов, поскольку выведенная из нуклеотидной последовательности первичная структура N-конца полностью соответствует N-концевой аминокислотной последовательности, определенной в ревертазе из *AMV*-комплекса [8]. Окончательный ответ на вопрос о роли ревертазы *MAV-1* в репликации комплекса *AMV* можно будет дать при наличии аминокислотной последовательности N-конца ревертазы другого вируса-помощника, а именно: *MAV-2*. Из работы Кэн и др. [5] следует, что, по-видимому, ревертазы этих вирусов чрезвычайно близки, поскольку среди 202 сиквенированных нуклеотидных остатков 3'-конца гена *pol MAV-2* есть только одно различие — молчащая замена G на C в положении 5145, нарушающая полную гомологию с соответствующим районом нуклеотидной последовательности *MAV-1*, определенной в данной работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baluda M. A., Goetz T. E. Morphological conversion of cell culture by avian myeloblastosis virus // *Virology*.—1961.—15, N 2.—P. 185—193.
2. Moscovici C., Zanetti M. Studies on single foci of hematopoietic cells transformed by myeloblastosis virus // *Ibid.*—1970.—42, N 1.—P. 61—67.
3. Moscovici C., Vogt P. K. Effects of genetic cellular resistance on cell transformation and virus replication in chicken hematopoietic cell cultures infected with avian myeloblastosis virus (BA1-strain) // *Ibid.*—1968.—35, N 4.—P. 489—497.
4. Nucleotide sequence of transforming gene of avian myeloblastosis virus / K. E. Ruslov, J. A. Lautenberger, T. S. Papas et al. // *Science*.—1982.—216, N 9.—P. 1421—1423.
5. Kan N. C., Baluda M. A., Papas T. S. Sites of recombination between the transforming gene of avian myeloblastosis virus and its helper virus // *Virology*.—1985.—145, N 3.—P. 323—329.
6. Reverse transcriptase activity per virion for avian myeloblastosis virus and Rauscher murine leukemia virus / L. F. Liebes, M. A. Rich, J. J. McCormic et al. // *J. Virol.*—1976.—18, N 1.—P. 42—47.
7. Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus / G. E. Houts, M. Mijagi, C. Ellis et al. // *Ibid.*—1979.—29, N 2.—P. 517—522.
8. Copeland T. D., Grandgenet D. P., Oroszlan S. // Amino acid sequence analysis of reverse transcriptase subunits from avian myeloblastosis virus // *Ibid.*—1980.—36, N 1.—P. 115—119.
9. Identification of avian myeloblastosis virus genome. Restriction endonuclease analysis of DNA from proviral recombinants and leukemic myeloblast clones / L. M. Souza, M. J. Briskin, R. L. Hillard et al. // *Ibid.*, N 2.—P. 325—336.
10. Biologically active proviral clone of myeloblastosis-associated virus type 1: implication for the genesis of avian myeloblastosis virus / B. Perbal, J. S. Lipsick, J. Svoboda et al. // *Ibid.*—1985.—56, N 1.—P. 240—244.
11. Lipsick J. S., Ibanez C. E., Baluda M. A. Expression of molecular clones of *v-myb* in avian and mammalian cells independently of transformation // *Ibid.*—1986.—59, N 2.—P. 267—275.
12. Maniatis T., Fritsch E. E., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982.—545 p.
13. Hanahan D. Techniques for transformation of *Escherichia coli* // *DNA Cloning* / Ed. D. M. Glover.—Oxford: IRL press, 1985.—Vol. 1.—P. 109—136.
14. Restriction endonuclease and nucleotide sequence analysis of molecularly cloned unintegrated avian tumor viruses DNA: structure of LTR in circle junction / R. A. Katz, C. A. Omer, J. H. Wies et al. // *J. Virol.*—1982.—42, N 1.—P. 346—351.
15. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminator inhibitor // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1977.—74, N 12.—P. 5463—5467.
16. Sanger F., Coulson A. R. The use of thin acrylamid gels for DNA sequencing // *FEBS Lett.*—1978.—87, N 1.—P. 107—110.
17. March C. Fast analysis of DNA and protein sequence on APPLE II: restriction sites search, alignment of short sequence and dot matrix analysis // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14, N 1.—P. 583—590.
18. Chou P. Y., Fasman G. D. Prediction of protein conformation // *Biochemistry*.—1974.—13, N 2.—P. 222—232.
19. Schwartz D. E., Tizard R., Gilbert W. Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus // *Cell*.—1983.—32, N 6.—P. 853—869.
20. Sudol M., Lerner T. L., Hanajusa H. Polymerase-defective mutant of the Bryan high-titer strain of Rous sarcoma virus // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14, N 5.—P. 3291—3294.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 17.01.89

DETERMINATION OF 5'- AND 3'-NUCLEOTIDE SEQUENCE OF *MAV-1 POL* GENE

S. V. Shugun, A. P. Koval, V. M. Kavsan
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The nucleotide sequences of 5'-, and 3'-terminal parts of *MAV-1 pol* gene are determined. 94.6 % homology between RSV and *MAV-1* reverse transcriptase genes has been established. Only 15 base pairs from the sequencing regions differ from the corresponding RSV sequence. Six of them determine amino acids substitutions. The asparagin appearance in position 15 of the *MAV-1* reverse transcriptase is in accordance with the previous data on protein. This observation may serve as an evidence, that the *MAV-1 pol* gene codes for reverse transcriptase of AMV-complex.