



УДК 578.113.3 : 578.828.11

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА 3'-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ
КЛОНИРОВАНИЯ кДНК ВИРУСА БЫЧЬЕГО ЛЕЙКОЗА

Иванова М. Н., Бычко В. В.*, Мелдрайс Я. А.,
Циманис А. Ю.*, Дрешер Б.**,
Вебер С.***, Розенталь З.**

Институт микробиологии им. А. Кирхенштейна
Академии наук ЛатвССР, Рига;

*Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига;

**Центральный институт молекулярной биологии Академии наук ГДР,
Берлин-Бух, ГДР;

***Институт эпидемиологии им. Фридриха Лёффлера, ГДР

Вirus бычьего лейкоза (BLV) является экзогенным вирусом, вызывающим лейкоз крупного рогатого скота, способным также трансформировать В-лимфоциты *in vitro* [1]. Механизм трансформации В-лимфоцитов данным вирусом неясен, так как геном BLV не несет типичного онкогена [2]. Кроме того, не обнаружены сайт-специфичность интеграции генома BLV в геном клетки-хозяина и экспрессия провируса в опухолях [3, 4]. Установлено, что в трансформированных клетках присутствуют дефектные про-вирусы с делециями в 5'-концевой области генома [3], что указывает на возможную роль 3'-концевого участка генома BLV в трансформации.

BLV по своим этиологическим свойствам и структуре генома весьма сходен с вирусами Т-клеточной лейкемии человека (HTLV-I, II). Структурное сходство их геномов выражается в уникальной структуре длинных концевых повторов (LTR), отсутствии типичных онкогенов и гомологии генов *gag*, *pol* и *env* [5, 6]. Недавно была выдвинута гипотеза о транс-активации промоторов LTR HTLV-I, II продуктом гена X, который расположен в вирусном геноме между геном *env* и 3'-LTR [7]. Аналогичный ген был обнаружен и у BLV [8], что подтверждается и нашими результатами. В рамках данной гипотезы постулирован новый механизм канцерогенеза вирусами HTLV и BLV путем транс-активации клеточных генов продуктом вирусного гена X [7, 8]. В данной работе представлена первичная структура 3'-концевой области генома BLV, несущего гипотетический ген X.

кДНК 3'-концевой области генома BLV была получена и клонирована в *E. coli*, как описано ранее [5]. Были отобраны рекомбинантные плазмиды pLV10 (содержащая ген X, 1016 п.о.) и pLV12 (содержащая U3- и R-участки LTR, 660 п.о.), причем BLV-вставки обеих плазмид перекрывались на протяжении ~200 п.о. Нуклеотидная последовательность плазмиды pLV10 была определена методом Максама — Гилберта, а плазмиды pLV12 — методом Сэнгера с использованием дидезокситерминаторов [9, 10], причем вся исследуемая ДНК BLV была секвенирована по обоим цепям. На рисунке представлена определенная нами нуклеотидная последовательность 3'-концевой области кДНК BLV длиной 1474 п.о. Фрагмент ДНК с 1-й по 1016-ю п. о. соответствует вставке плазмиды pLV10, а с 815-й по 1474-ю п. о. — вставке плазмиды pLV12. Следует отметить, что структура вставок обеих плазмид в районе перекрывания (815—1016 п. о.) оказалась полностью идентичной.

Участок генома BLV, расположенный перед 3'-LTR, несет четыре открытые фазы трансляции (pX-1, pX-2, pX-3 и pX-4), способные кодировать полипептиды длиной 308, 148, 87 и 85 аминокислотных остатков соответ-

1 TCCACCTCG GCACCGACTC CCCC GCCGAG CCTTCGAGC TCTTCGGGAT
 51 CCATTACCTG ATAACGACAA AATTATTTCT TGTCTTTTAA GCAAGTGTG
 101 TTGGTTGGGG GCGCCACTCT CTACATGCCT ACCCGGCCCT GGTTCCTCC
 151 AATGATGTCA CCATCGATGC CTGCTGCCCG CTCTCGGGCC CCCATGAGCC
 201 ACTCCAATTC GAAAGGATCG ACACCGAGCT CACCTGGGAG ACCCACCCTA
 251 TCACCTGGAC CGCCGATGGA CGACCTTCGG GCTTCAATGC AACCTTCTTC
 301 CCTCCACTGC ATGTCTCCGA CACCCGCCCG CAAGGGCCCC GACGACTCTG
 351 GATCAACTGC CCCCTTCGGG CGCTTCGGCG TCAGCCCGCG CGGTTTCAC
 401 TTTCCCCCTT CGACCGCTCC CCCTTCAGC CCTACCAATG CCAATTGCCC
 451 TCGGCCTCTA GCGACGCTTC CCCCATCATC GGCACGGGCC TTCTTCCTG
 501 GAACAACCTA GTAACGCATC CTGCTCTCAG AAAAGTCTTT ATATTAAATC
 551 AAATGCCCAA TTTTCTCTTA CTCCCCCTTC TCGATACCCT CCTGTGAGAC
 601 CCCCTCCGGC TGTCCGTCTT TGCCCCAGAC ACCAGGGGAG CCATACCTTA
 651 TCTCTCCACC STTTTGAGCG TATGCCCGGC TACTTGATTT STACCCCTAG
 701 GCGAGCCCTT CTCTCCTAAT GTCCCATATG GCGGTTTCC CGGGGACTCC
 751 AATGAACCCC CCCTTTCAGA ATTCGAGCTC CCCCTTATCC AAACGCCCGG
 801 CCTGTCTTGG TCTGTCCCGG CGATCGACCT ATTCCTAACC CGTCCCCCTT
 851 CCCCATGCCA CCGGTACAC STATGCTCCA GTCTCAGGC TTACAGCGC
 901 TCTCTCATG ACCCTACGCT AACCTGCTCC GAATTAGTTG CTAGCAGAAA
 951 AATAAGACTT GATTCSSCCT TAAATTCASA ACTGCTAGAA AATGAATGGC
 1001 TCTCCCGCCT TTTTGGAGCG GGAATCATTT GTATGAAACA TCATGCCGCG

ственно. Недавно были опубликованы данные о различиях в первичной структуре данного участка генома (1—1029 п. о.) двух независимо полученных провирусов (японский и бельгийский варианты [6]), отличающиеся от нашего варианта BLV 12 и 31 нуклеотидными заменами соответственно. При этом делеции и вставки нуклеотидов не обнаружены. Если какая-либо открытая фаза трансляции несет кодирующую функцию, то нуклеотидные замены в этом районе ДНК будут локализованы преимущественно в положениях, не приводящих к аминокислотным заменам. Доля синонимических замен в фазе трансляции рХ-1 составляет 64% от общего числа нуклеотидных замен (вместо 20% при случайном распределении), в то время как в рХ-2 все девять нуклеотидных замен приводят к заменам аминокислот. По-видимому, 3'-концевая область генома BLV несет один ген, соответствующий открытой фазе трансляции рХ-1, который кодирует полипептид с мол. массой 34 200 Да. Поскольку первый иницирующий кодон в фазе рХ-1 локализован на расстоянии 463 п. о. от ее начала, можно предположить, что мРНК рХ-1 подвергается сплайсингу. Это также подтверждается наличием канонической последовательности TTTCTGTCTTTTAAAG в положении между 76—91-й п. о. (см. рисунок),

1051	CTAGGCGCCC CCACCGCCCC GTAAACGAGA CAGACAGCTC ACCTGCCAGA
	"CAT"
1101	AAAGCTCTGT ACGGAGCTGT GTGGCTAGAA TCCCGGTACC TCCCAACTT
	C
1151	CCCCTTTCCC GAAAAATCCA CACCCTGAGC TGCTGACCTC ACCTGCTGAT
	"TATA"
1201	AAATTAATAA AATGCCGGCC GTGTGGAGTT AGCGGCACCA GAAGCCTTCT
	GGP
1251	TCCTCTGAGA CCCTCGTGGT CAGCTCTCGG TCCTGAGCTC TCTTGTCTCC
	C A
1301	CAGACCTTCT GGTCCGCTAT CCGGCACCGG TCAGCTAAGC CAAACACGG
	CV
1351	TTTGGAGGCT GGTCTCGCC TGAGACCACT CGAGCTCTAT CTCGGCTCTT
	C G A C
1401	CTGACGCTCT CCAGGTGGAC TCTCTCTTT CCCTCTGAC CCGCGCTCC
	TC
1451	AAGCGCTCT GCCTCCACC CGCA
	poly(A)

Первичная структура 3'-концевой области клонированной кДНК BLV. Выше и ниже нуклеотидной последовательности приведены замены нуклеотидов по сравнению с провирусной ДНК BLV (соответственно японский и бельгийский варианты [6]). Стрелками указаны координаты открытых фаз трансляции рХ-1 — рХ-4. Отмечены 5'-концевая граница LTR, «CAT»- и «TATA»-последовательности, участки «экспирования» и полиаденирования мРНК

соответствующей акцепторному участку сплайсинга мРНК непосредственно перед началом рХ-1.

В настоящее время имеются данные о наличии синтеза белка, кодируемого мРНК рХ-1, в трансформированных HTLV-I-клетках [11]. Фаза трансляции рХ-1 у BLV сходна с геном Х HTLV-I по длине и локализации, и, более того, аминокислотные последовательности, соответствующие рХ-1 BLV и рХ HTLV-I, имеют низкую, но существенную гомологию (25–30%), а на протяжении 80 N-концевых аминокислот гомология достигает 35% [6]. На основании вышеизложенного можно допустить, что открытая фаза трансляции рХ-1 BLV соответствует гену, продукт которого образуется в клетках, зараженных BLV, и, вероятно, участвует в транс-активации промотора LTR BLV.

По-видимому, С-концевая часть молекулы гипотетического белка рХ BLV наиболее существенна для его функции, поскольку у трех проанализированных вариантов BLV наиболее консервативны 40 С-концевых аминокислот рХ-1 (11 из 13 нуклеотидных замен, или 85%, являются синонимическими).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kettmann R., Cleuter Y., Mammerickx M., Meunier-Rotival M., Bernardi G., Burny A., Chantrenne H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 5, p. 2577–2581.
2. Deschamps J., Kettmann R., Burny A. J. Virol., 1981, v. 40, № 2, p. 605–609.
3. Kettmann R., Deschamps J., Cleuter Y., Couez D., Burny A., Marbaix G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 8, p. 2465–2469.
4. Kettmann R., Deschamps J., Couez D., Claustriaux J., Palm R., Burny A. J. Virol., 1983, v. 47, № 1, p. 146–150.
5. Tsimanis A., Bichko V., Dreilina D., Meldrais Y., Lozha V., Kukain R., Gren E. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 17, p. 6079–6087.
6. Sagata N., Yasunaga T., Ohishi K., Tsuzuku-Kavamura Y., Onuma M., Ikawa Y. EMBO J., 1984, v. 3, № 13, p. 3131–3137.
7. Sodroski Y., Rosen C., Haseltine W. Science, 1984, v. 225, № 4660, p. 381–385.
8. Rosen C., Sodroski Y., Kettmann R., Burny A., Haseltine W. Science, 1985, v. 227, № 4684, p. 320–323.
9. Mazam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
10. Sanger P., Nicklen S., Coulson R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 10, p. 5463–5467.
11. Lee T., Coligan J., Sodroski Y., Haseltine W., Salahuddin S., Wong-Staal F., Gallo R., Essex M. Science, 1984, v. 226, № 4670, p. 57–61.

Поступило в редакцию
29.VII.1985

THE PRIMARY STRUCTURE OF THE[3'-TERMINAL REGION OF THE CLONED
BOVINE LEUKAEMIA VIRUS cDNA

IVANOVA M. N., BICHKO V. V.*, MELDRAIS J. A.,
TSIMANIS A. Yu.*, DRESHER B.**, VEBER S.***, ROSENTHAL S.**

*A. Kirichenstein Institute of Microbiology, Academy of Sciences
of the Latvian SSR, Riga;*

**Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the
Latvian SSR, Riga;*

***Central Institute of Molecular Biology, GDR Academy of Sciences,
Berlin-Buch, GDR;*

****Friedrich Loeffler Institute of Epidemiology, GDR*

The nucleotide sequence of the 3'-terminal region of the cloned bovine leukaemia virus cDNA (1474 bp) was elucidated using both Sanger and Maxam – Gilbert techniques. This DNA region contains U3 and R parts of the BLV LTR and an upstream sequence with four open reading frames (ORF) of unknown function. The comparison of the nucleotide substitutions in these ORF with the two variants of proviral BLV DNA suggests that the only pX1 ORF possesses a coding function. The role of the pX1 protein is discussed.