

Л.А.Зильбер  
И.С.Ирлин  
Ф.Л.Киселев

ЭВОЛЮЦИЯ  
ВИРУСО-  
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ТЕОРИИ  
ВОЗНИКНОВЕНИЯ  
ОПУХОЛЕЙ



• Академия наук СССР  
Научный совет  
по проблемам молекулярной биологии

Л. А. Зильбер  
И. С. Ирлин  
Ф. Л. Киселев

ЭВОЛЮЦИЯ  
ВИРУСО-  
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ТЕОРИИ  
ВОЗНИКНОВЕНИЯ  
ОПУХОЛЕЙ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»  
МОСКВА 1975



616.006.0

3-61

УДК 616.988.6

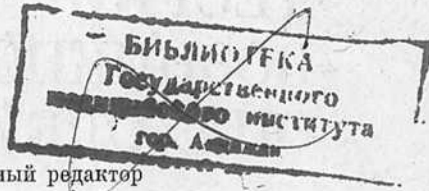
✓ 138785

Эволюция вирусо-генетической теории возникновения опухолей. Зильбер Л. А., Ирлин И. С., Киселев Ф. Л. М., «Наука», 1975, стр. 1—345.

В книге обобщены современные данные о свойствах онкогенных вирусов, основных свойствах клеток вирусных опухолей или клеток, трансформированных онкогенными вирусами, о мутантах онкогенных вирусов и опухолевых клеток, эндогенных вирусах и их роли в онкогенезе и об обратной транскрипции при онкогенезе. Отдельный раздел книги посвящен индукции онкогенных вирусов в опухолевых и нормальных клетках.

Книга рассчитана на биологов всех специальностей, а также научных работников, врачей, преподавателей и студентов, интересующихся проблемами биологии и онкологии.

Табл. 1. Илл. 2. Библ. 28 стр.



Ответственный редактор  
доктор биол. наук  
профессор Г. И. АБЕЛЕВ

616.006.01 + 616.013.8



3  $\frac{21005-505}{055(02)-75}$  577-75

© Издательство «Наука», 1975 г.

---

## ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА

Вирусно-генетическая теория Л. А. Зильбера в ее окончательном варианте сложилась к 1960—1961 гг., к тому периоду развития вирусологии рака, когда в распоряжении экспериментаторов уже были необходимые модели и методические подходы для анализа отношений онкогенного вируса и клетки и самой природы опухолевой трансформации. Это и определило ее большую плодотворность.

Основные положения теории выросли из глубокого убеждения Л. А. Зильбера о принципиально иных отношениях вируса и клетки при обычной вирусной инфекции и опухолевой трансформации. Это убеждение, ясно сформулированное еще в 1945 г., возникло из анализа литературы, своих первых опытов, обдумывания общеизвестных фактов и все более укреплялось в результате последующих многолетних исследований. Оно вылилось в конечном счете в постулирование интеграционного типа взаимодействия онкогенного вируса и трансформированной им клетки. Интеграция геномов вируса и клетки составила суть вирусно-генетической теории и выражала специфику онкогенного действия вируса и основную причину трансформации. Казалось, что при доказательстве интеграции будет принципиально решена проблема вирусного канцерогенеза.

В 1965—1966 гг. Лев Александрович работает над монографией «Вирусно-генетическая теория возникновения опухолей», в которой он стремится рассмотреть все аспекты вирусологии рака с позиций своей теории. Книга была закончена в октябре — ноябре 1966 г., накануне полного торжества идей, в ней высказанных — доказательства интеграционного типа отношений для всех онкогенных вирусов — ДНК- и РНК-содержащих. Поэтому первый замысел настоящей монографии сводился к переизданию книги Л. А. Зильбера с включением в нее глав, окончательно доказывающих справедливость вирусно-генетической теории. Но это оказалось невозможным. Бурное развитие вирусологии рака и особенно ее молекулярно-генетических направлений, развитие, в котором достойное место заняли все основные положения вирусно-генетической теории, показало, что эти положения состав-

ляют лишь часть общей теории вирусного канцерогенеза — теории, контуры которой лишь начинают вырисовываться в последние годы. Становится все более и более ясным, что сама по себе интеграция вирусного и клеточного геномов, всегда имеющая место при вирусном канцерогенезе, еще не ведет автоматически к трансформации нормальной клетки в опухолевую. Твердо доказанное к настоящему времени присутствие генома онкогенных РНК-содержащих вирусов в геноме нормальных клеток ясно говорит о том, что должно существовать какое-то принципиальное различие между «нормальной» и «патологической» интеграцией, либо принципиальное различие онкогенных и неонкогенных вариантов онкорнавирусов — различие, которое не относится к их способности к интеграции с клеточным геномом. Все более реальным становится понятие онкогена — вирусного гена (или генов), ответственного за трансформацию. Интеграционный тип отношений в этом случае играет лишь вспомогательную роль, закрепляя геном вируса в трансформированной клетке и предотвращая ее гибель.

Новые, наиболее общие гипотезы вирусного канцерогенеза — такие, как гипотеза вирогена Хюбнера и Тодаро или протовируса Темина — включают уже как непреложный факт все положения вирусно-генетической теории Зильбера. И сюда входит не только постулированная им интеграция, но и непрямо вирусный канцерогенез<sup>1</sup>, и обусловленная вирусом индукция в клетке специфических, чужеродных для нее опухолевых антигенов. Такова почетная судьба каждой подлинно научной теории — сыграть роль катализатора в современной ей науке и войти как неизменная часть в последующие более широкие построения.

Очевидно, что обнаружение генома «эндогенных» онкорнавирусов в геноме каждого организма заставляет пересмотреть всю проблему происхождения онкогенных вирусов этой группы, с новых позиций подойти к непрямо вирусному канцерогенезу и сконцентрировать внимание исследователей на поисках «генов трансформации» в генотипе самого вируса. Естественно, что эти факты, полученные лишь в последние пять лет, не могли рассматриваться вирусно-генетической теорией. Но так же естественно, что их детальный анализ вошел в настоящую монографию, подводящую читателя к фронту современных исследований и теоретических построений в области вирусного канцерогенеза. Последнее и стало основной задачей в процессе работы над книгой. И это же определило «открытый», незавершенный характер каждой из новых глав, да и всей книги в целом. Каждая из

<sup>1</sup> Действие канцерогенных факторов путем активации латентного онкогенного вируса.



затронутых в ней проблем еще открыта для новых фактов и новых гипотез.

Вирусно-генетическая теория канцерогенеза выдвинула на первый план необходимость молекулярно-биологических подходов к проблеме онкогенных вирусов. Сам Л. А. Зильбер придавал им решающее значение и считал своей главной задачей в последние годы жизни организовать такие исследования и вовлечь в изучение вирусного канцерогенеза молекулярных биологов классического направления.

Но лишь в самые последние годы у нас в стране началось движение вирусологов к молекулярной биологии и молекулярных биологов — к онковирусологии. Отсюда и другая задача книги — дать возможно более полное представление о молекулярных аспектах проблемы, о том стремительном прогрессе знаний в этой области, который привел к открытию обратной транскрипции, идентификации вирусного генома в геноме трансформированной клетки, к определению функций интегрированного генома, к построению генетических карт самих онкогенных вирусов. Имея в виду читателя-вирусолога, авторы изложили принципы молекулярно-биологических методов, используемых при решении онковирусологических проблем.

Особенность молекулярных исследований в онкологии — в их неотделимости от специфики биологического объекта. Причины собственно злокачественного роста ткани — в нарушении клеточных взаимодействий, в выходе клетки из-под влияния регулирующих систем организма, в нарушении равновесия между стволовыми и дифференцированными элементами тканевой системы.

Признак или процесс, подлежащий изучению, должен быть предельно четко очерчен на клеточном уровне, прежде чем он может стать объектом для молекулярных исследований. Только после того, как стало возможным для систем *in vitro* сформулировать элементарные признаки трансформации в четких биологических терминах, эти признаки поведения клеток «созрели» для молекулярной биологии. В области автономного роста ткани вначале также необходимо ясно себе представить, какие тканевые элементы являются клетками-мишенями для регуляции, как меняется их поведение при взаимодействии с вирусом, какому контролю и какие клетки перестают подчиняться. Без этого молекулярное изучение рака беспочвенно. Более того, плодотворность в решении молекулярно-биологических проблем вирусного канцерогенеза в значительной мере, а иногда и полностью, определяется разработкой адекватной биологической модели — модели, в которой исследуемый признак был бы введен как бы в уравнение с одним неизвестным.

Термочувствительные мутанты онкогенных вирусов с дискретным выпадением элементарных функций, включая такие, как спо-

способность к интеграции или трансформации, являются идеальными системами для молекулярно-биологического анализа. К ним приближаются и термочувствительные клеточные мутанты, в которых нормальный (немутантный) вирусный геном способен поддерживать состояние трансформации клетки-мутанта лишь при перmissive температуре.

Весь этот материал подробно приведен в книге и детально проанализирован.

Из монографии Л. А. Зильбера в настоящую книгу включены три главы, составляющие первую часть книги. В одной из них даются все этапы становления вирусно-генетической теории (глава I), в другой — окончательная формулировка ее с конкретными следствиями и перспективами развития (глава III). Глава II, излагающая некоторые общие теории вирусного канцерогенеза, представляет в настоящее время лишь исторический интерес, но мы включили ее, поскольку она дает представление о ситуации того времени в вирусологии рака, когда писалась книга Л. А. Зильбера. В данной книге все эти главы объединены в одну первую главу.

Мы надеемся, что настоящая монография стимулирует дальнейшее развитие идей и направлений, которым отдал весь свой блестящий талант и кипучий темперамент основоположник нашей онковирусологии Лев Александрович Зильбер.

Профессор *Г. И. Абелев*

## ВИРУСО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ

---

### Глава первая РАЗВИТИЕ УЧЕНИЯ О РОЛИ ВИРУСОВ В ВОЗНИКНОВЕНИИ ОПУХОЛЕЙ

#### ИСТОРИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУСНОЙ ТЕОРИИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ

На протяжении истории изучения рака возникало много различных предположений, гипотез и теорий, пытавшихся объяснить возникновение этой тяжелой болезни. Вполне естественно, что новые факты, получаемые при изучении опухолей, давали основу для предположений об их природе и причине возникновения. Однако очень немногие из подобных концепций дожили до нашего времени и продолжают служить основой для прогресса в изучении опухолей.

Нельзя не отметить, что значение тех или других исследований в области изучения природы рака (как и в других областях науки) далеко не объективно оценивалось современниками. Для примера можно указать, что в 1926 г. Нобелевская премия была присуждена доктору Фибигеру за работу, в которой была отмечена возможная роль паразитических червей в возникновении опухоли желудка крыс. Хотя эта работа и представляла интерес, она не оправдала надежд, которые возлагались на нее при присуждении Нобелевской премии, и не сыграла какой-либо роли в развитии учения о раке как в теоретической, так и в практической областях.

Вместе с тем работы Эллермана и Банга (Ellermann, Bang, 1908) и Рауса (Rous, 1911), впервые установившие вирусную природу некоторых форм лейкозов и опухолей у птиц и создавшие новое, весьма перспективное направление в изучении рака, долгое время игнорировались исследователями и не получали высокой оценки. Лишь в 1965 г., спустя 50 лет после своего открытия, П. Раус был удостоен Нобелевской премии.

Мысль о том, что раковые опухоли могут быть вызваны агентом вирусной природы, впервые высказали Боск (Bosc, 1903) и Боррель (Borrel, 1903). Изучая оспу овец и другие болезни, сопровождающиеся сыпью, при которых имеет место усиленная пролиферация клеток, они обратили внимание на сходство патологи-



ческих процессов при этих болезнях с наблюдаемыми при эпителиомах и высказали предположение, что они могут вызываться сходными агентами.

✧ Боррель писал: «Мы будем сравнивать сыпные болезни и оспу овец в особенности с раком... с точки зрения анатомических поражений и будем более близки к истине, если просто констатируем, что вирусы этих болезней, еще неизвестные, обладают предпочтительным действием на эпителиальную ткань и определяют в самом широком смысле слова образование эпителиальных опухолей» (Borrel, 1903, стр. 83). ✓

Боррель включил в группу «эпителиозы» заболевания, вызываемые вирусами вакцины оспы, овечьей оспы, контагиозного моллюска, и другие заболевания, при которых реакция организма на вирус проявляется в виде пролиферации эпителиальной ткани с образованием пустул и даже, как он думал, эпителиальных опухолей. Он полагал, что «действие этих маленьких вирусов на эпителиальные клетки при эпителиозах позволяет до некоторой степени понять действие ракового вируса в собственно эпителиомах».

✓ Таким образом, Боррель представлял себе действие гипотетических раковых вирусов аналогичным действием инфекционных вирусов. И те и другие вызывают пролиферацию клеток, и именно это действие приводит к тем или другим патологическим процессам, в том числе и к образованию опухоли.

Резюмируя свою работу, Боррель писал, что он хотел бы особенно отметить, что раковые заболевания не составляют совершенно обособленной патологической группы, не имеющей аналогии с болезнями, вызываемыми вирусами. Вместе с тем он подчеркивал, что этиология злокачественных опухолей остается еще темной, и что отсутствует «слишком интимная связь между эпителиозами и эпителиомами. ...Есть аналогия, нет идентичности» (Borrel, 1903, стр. 118).

Работа Борреля, опубликованная в 1903 г., вызвала возражения Боска (Bosc, 1903), который оспаривал приоритет в установлении аналогии между пролиферативными процессами, вызываемыми вирусами, и эпителиальными раками.

Боск указывал, что в более ранней своей работе он характеризовал образования, появляющиеся при овечьей оспе, как эпителиальную пролиферацию и отмечал далее «существование группы паразитарных болезней, способных вызвать поражения, типичные для эпителиального рака. Мы включили рак в группу вирулентных воспалительных заболеваний» (Bosc, стр. 414). Он писал далее (стр. 415), что «вирус овечьей оспы... вызывает на всех территориях организма, куда он проникает, пролиферативную реакцию неопластического характера».

Таким образом, и ✓ Боррель и Боск обратили внимание на сходство пролиферативных процессов, вызываемых некоторыми ви-

русами (особенно овечьей оспы) и наблюдаемых при раках, и высказали предположение о возможном сходстве их возбудителей.

Конечно, это еще не была теория, а только гипотеза, выраженная в очень общей форме и базирующаяся только на аналогии, но не на эксперименте. Однако это не уменьшает заслуги Борреля и Боска. Они впервые назвали новую возможную причину возникновения рака. ✓

Их работы не привлекли к себе сколько-нибудь заметного внимания, и первое экспериментальное подтверждение того, что вирусы могут вызывать неопластические процессы, было получено только в 1908 и 1911 гг. в опытах Эллермана и Банга (Ellermann, Bang, 1908) и Рауса (Rous, 1911), установивших вирусную этиологию лейкоза и саркомы кур. Однако в то время лейкозы не относили к неопластическим заболеваниям.

✓ Интересно отметить, что идея о возможной роли вируса в происхождении рака была поддержана И. И. Мечниковым, еще до появления работы Рауса. В своей речи на празднестве в честь Дарвина в Кембридже в 1909 г. И. И. Мечников, отмечая большое влияние на медицину теории Дарвина, критиковал при этом эмбриональную теорию возникновения рака и сказал: «Весьма вероятно, таким образом, что раковые заболевания человека также обязаны своим происхождением какому-нибудь вирусу, который усердно ищут, но еще не обнаружили»<sup>1</sup>. ✓

В 1910 г. в статье, посвященной Международному раковому конгрессу в Париже, И. И. Мечников (1910) отмечал, что одного проникновения вирусов («заразных начал, которые не могут быть обнаружены даже сильнейшими увеличениями самых лучших микроскопов») в организм недостаточно для возникновения рака. Нужны условия, создающиеся в организме в результате самых разнообразных причин, и только при этих условиях вирус может вызвать образование опухоли. Одним из важных условий И. И. Мечников считал наличие хронических поражений тканей.

Таким образом, И. И. Мечников указывал на возможную роль вирусов в возникновении опухолей и утверждал, что они могут проявить свою болезнетворность только при определенных условиях — положение, получившее полное подтверждение при изучении многих опухолей вирусного происхождения.

✓ Конец прошлого и начало нынешнего столетия вошли в историю медицины под названием «бактериологической эры». Это была эпоха великих бактериологических открытий, когда были обнаружены возбудители многих инфекционных болезней. В то время было опубликовано немало сообщений о выделении бактерий из

<sup>1</sup> Речь И. И. Мечникова о праздновании в честь Дарвина в 1909 г. была опубликована только в 1943 г. в книге И. И. Мечникова «О дарвинизме». М.—Л., Изд-во АН СССР, стр. 223.

опухолевых тканей. Предполагали, что эти бактерии являются возбудителями злокачественного роста. Это оказалось неверным. Бактерии действительно могут быть выделены из опухолей в некоторых случаях, но они являются не их возбудителями, а контаминантами, поселяющимися в уже образовавшихся опухолях, особенно при наличии некрозов.

К этому времени получили также полное подтверждение наблюдения М. А. Новинского (1876), впервые показавшие возможность переноса опухолей с одного животного на другое. Опухоли переносились только живыми клетками, и попытки перенести их экстрактами тканей или другими подобными препаратами всегда давали отрицательные результаты.

Все эти обстоятельства и обусловили недоверие, с которым были встречены работы Рауса (Rous, 1911), сообщившего о переносе фильтратом саркомы кур, и работы Фужинами и Инамото (Fujinami, Inamoto, 1914) о переносе фильтратом куриной миксосаркомы. По данным этих авторов, фильтраты содержали агент вирусной природы, который и являлся возбудителем злокачественного роста. Были выдвинуты многочисленные возражения против подобной интерпретации этих опытов, сводившихся в основном к утверждению о возможности прохождения через фильтр целых клеток или их фрагментов, которые потом регенерировали. Указывалось также, что опухоли, вызываемые фильтратами, представляют собою скорее воспалительную пролиферацию типа гранулемы, чем истинную саркому. Однако все эти возражения отпали при последующих тщательных исследованиях.

Многие отрицали вирусную природу агента, находящегося в фильтратах. Предполагали, что этот агент является «организатором», подобным открытому Шпеманом (Spemann, 1921) в эмбриональных тканях. Однако организаторы вызывают дифференцировку клеток, в то время как агент куриной саркомы вызывает их дедифференцировку. Они, кроме того, в отличие от агента куриной саркомы не размножаются в организме, воздействуют на эмбриональные клетки и переносят нагревание 100°.

Интересное предположение о природе агента куриной саркомы было сделано Клодом и Мёрфи (Claude, Murphy, 1933). Они полагали, что он подобен фактору, вызывающему трансформацию пневмококков, описанному Гриффитсом (Griffith, 1928)<sup>1</sup>. Природа этого фактора тогда не была известна. В последующем было установлено (Avery et al., 1944), что этот фактор является дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК).

<sup>1</sup> Наследственная серологическая трансформация впервые наблюдалась в наших опытах, в которых *Proteus vulgaris* был превращен в серологически новый тип *Proteus X 19* (Zilber, 1923).



Как мы увидим ниже, есть определенная аналогия в механизме действия вирусов и трансформирующего фактора пневмококков, так как и в том и в другом случае действие осуществляется нуклеиновыми кислотами и сопровождается трансформацией клеток. Однако, насколько известно, ни Клод, ни Мёрфи не развивали в последующем своих взглядов на механизм действия опухолевых вирусов и не пытались обосновать их экспериментально.

Были сделаны и некоторые другие предположения о природе агента, вызывающего куриную саркому. Нет необходимости обсуждать их, так как изучение этого агента показало, что он обладает всеми основными свойствами вирусов, в частности, сохраняется в глицерине, переносит высушивание, разрушается при нагревании, фильтруется через свечи, не пропускающие бактерий, и имеет корпускулярную природу, причем величина его частиц приблизительно равна 100 нм (Ledingham, Gye, 1935).

Открытие Рауса не было одиночным. Вскоре им вместе с сотрудниками была описана остеосаркома кур, также передающаяся фильтратом (Rous, Murphy, 1914), и фильтрующаяся ангиосаркома кур (Rous, Lange, 1913). Еще ранее доказана, как указывалось выше, вирусная природа лейкоза кур.

Однако все попытки обнаружить вирусы, вызывающие опухоли у млекопитающих, были долгое время безуспешными. Только в 1932—1933 гг. впервые обнаружены вирусные опухоли у млекопитающих. Это открытие сделано Шоупом (Shope, 1932, 1933). Первая из этих опухолей, обнаруженная у диких кроликов, представляла собой фиброму, которая рассасывалась после достижения определенной величины. Вызывающий ее вирус оказался родственным вирусу миксоматоза кроликов.

Вторая описанная Шоупом опухоль — это папиллома диких кроликов, также переносимая фильтратом как на диких, так и на домашних кроликов. При изучении этой опухоли было обнаружено, что после нескольких месяцев роста она перерождается в карциному, причем у домашних кроликов чаще, чем у диких. Это перерождение сопровождается исчезновением вируса. Однако вирусный антиген обнаруживался в карциноме при длительных пассажах.

Следующим важным этапом в развитии вирусной теории происхождения опухолей было открытие Биттнером (Bittner, 1936) вируса рака молочных желез мышей. Интересны этапы этого открытия. После того как Слай и другие американские исследователи (Slye et al., 1914) вывели инбредные линии мышей, оказалось возможным экспериментально изучать роль наследственности в возникновении опухолей. При отборе и последующем скрещивании мышей из семей, где встречались опухоли молочных желез, и из семей, где они были очень редкими, были вы-

ведены «раковые штаммы» мышей, среди которых заболеваемость раком молочных желез была почти поголовной, и «нераковые штаммы», среди которых заболевания были единичными. Сам этот факт давал, казалось бы, блестящее подтверждение генетической теории происхождения рака, согласно которой его возникновение обусловлено генетическими факторами. Однако вскоре было выяснено, что влияние на частоту рака молочных желез у мышей не связано с хромосомами, а обусловлено вирусом, который передается с молоком от матери к потомству.

✓Открытие вируса Биттнера оживило интерес к изучению роли вирусов в происхождении опухолей; это изучение развивалось все возрастающими темпами и особенно усилилось в последние два десятилетия.

Особо важным в этот период было открытие Гроссом (Gross, 1951) вируса мышшиной лейкемии, создавшее новую главу экспериментальной онкологии.

Большинство исследователей до последних лет следовало классическим представлениям о роли опухолевых вирусов, считая их инфекционными агентами, побуждающими клетки к усиленному размножению. Шоуп рассматривал открытый им вирус папилломы в качестве инфекционного агента, о чем говорит само название его работы (Shope, 1933).

Раус также считал опухолевые вирусы инфекционными агентами, постоянно возбуждающими клетки к неопластической активности. В 1943 г. он писал (Rous, 1943, стр. 575): «... вирусы сопровождают измененные клетки, когда они, размножаясь, образуют опухоль, возрастают в количестве при увеличении последней и обычно могут быть выделены из пролиферирующей ткани в состоянии, при котором они способны индуцировать такую же опухоль у нового хозяина. Если они не обнаруживаются подобным образом, их присутствие может быть выявлено серологическими реакциями, так как они вызывают образование специфических антител... Они сохраняют свою активность в отношении клеток, которые ими инфицированы, постоянно побуждая последние к неопластической активности...» В противоположность этому другие канцерогены исчезают из ткани, прежде чем начинается неопластический процесс или вскоре после этого.

Еще более категорично мнение Николау (1955). На основании патоморфологического и патофизиологического анализа действия многих вирусов, вызывающих инфекционные и неопластические заболевания, он пришел к выводу, что при злокачественных опухолях «вирус постоянно вынуждает клетки к анархическому размножению, для которого не существует никакого препятствия» (стр. 44).

Таким образом, до сравнительно недавнего времени существовало представление, что опухолевые вирусы являются аген-

тами, побуждающими поражаемые ими клетки к неограниченному и перегулируемому размножению. Это представление в основном вполне соответствовало классической вирусной гипотезе, высказанной Боррелем и Боском.

В противоположность этому было выдвинуто другое представление об опухолевых вирусах (Зильбер, 1945), согласно которому: 1) они наследственно превращают нормальную клетку в опухолевую; 2) не играют роли в дальнейшем размножении уже возникших опухолевых клеток и 3) их действие принципиально отличается от инфекционного. В 1945 г. я писал: «При любом бактериальном или вирусном инфекционном заболевании все основные патологические процессы вызываются самим инфекционным агентом или выделяемым им токсином. При опухолях же основной патологический процесс вызывается вовсе не вирусом, роль которого сводится только к превращению нормальной клетки в опухолевую, а самой опухолевой клеткой, которая дает начало опухоли... Сходство с инфекцией здесь, в сущности говоря, только внешнее, поскольку речь идет об экстрацеллюлярном агенте, вторгающемся извне в клетку. Процесс же, который идет дальше, не имеет ничего общего с другими инфекционными процессами. Если некоторые неопухолевые вирусы способны вызвать клеточную пролиферацию, то это еще не значит, что они способны вызвать наследственные изменения свойств клетки. Эта последняя способность присуща только опухолевым вирусам, и характер их воздействия на клетку поэтому принципиально отличается от характера воздействия инфекционных агентов, вызывающих в основном воспалительные и некротические изменения» (Зильбер, 1945).

Что касается механизма наследственных изменений, вызываемых опухолевыми вирусами в клетках, то я считал его в то время подобным механизму наследственной серологической трансформации бактерий, наблюдавшейся в наших давних опытах с протейми (Zilber, 1923) и в опытах Гриффитса с пневмококками (Griffith, 1928). К 1945 г. были опубликованы данные Эвери и др. (Avery et al., 1944), показавшие, что трансформирующий фактор является дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК). Аналогичный взгляд, как указывалось выше, был высказан Клодом и Мёрфи (Claude, Murphy, 1933) относительно природы вируса Рауса, но эта работа не была мне известна в то время.

Вышеизложенные представления сложились на основе результатов наших опытов и анализа доступной в то время литературы.

Приступая к изучению возможной роли вирусов в происхождении опухолей, мы повторили прежде всего опыты с фильтрованием различных трансплантируемых опухолей, бывших в нашем распоряжении, наивно предполагая, что отрицательные результа-



ты подобных опытов обусловлены условиями, в которых происходит фильтрация.

Пользуясь самыми разнообразными фильтрами (в том числе и специально приготовленными из пористой резины) и фильтруя экстракты опухолей при самых различных условиях (температура, давление, прибавление антиокислителей, желатины и др.), мы ни в одном случае не могли выделить какого-либо фильтрующегося агента, способного вызвать неопластический процесс. Случайное наблюдение повело мысль по другому пути. Начинаясь рак молочной железы был обнаружен у беременной крысы, придавленной дверцей клетки. Бесклеточный экстракт этой опухоли вызвал появление рака молочной железы у одной из трех беременных крыс, которым он был введен.

Аналогичный результат был получен с бесклеточным экстрактом одной из сарком мышей, неожиданно обнаружившей резкое усиление злокачественности. Из этих случайных единичных наблюдений нельзя было сделать, конечно, никаких выводов, тем более что экстракты в этих опытах получались растиранием опухолевой ткани с последующим центрифугированием, а не фильтрованием, и в них могли остаться единичные клетки. Однако эти опыты породили предположение, что вирусный агент, может быть, обнаруживается только в молодых опухолях, только в самом начале опухолевого роста. Это предположение и было подвергнуто экспериментальной проверке. ✓

Основные опыты состояли в следующем. Мы вводили мышам 1, 2, 5, 6-дибензантрацен в растительном масле. Возникшие опухоли извлекали в самый начальный период их роста, когда их впервые можно было прощупать. После растирания из них готовили экстракты, которые фильтровали через свечу Баркефельда и вводили мышам. Опухоли растирали в атмосфере азота, чтобы предохранить предполагаемый вирусный агент от разрушения окислением. В связи с данными Рауса и Кидда и Рауса и Фридевальда (Rous, Kidd, 1938; Rous, Friedewald, 1941), показавших, что канцерогенные вещества значительно усиливают активность опухолевых вирусов, мы вводили наши фильтраты мышам, которых предварительно обрабатывали 1,2,5,6-дибензантраценом, в дозах, не вызывающих опухоли. Мы называли таких мышей сенсibilизированными. Результаты отдельных подобных опытов значительно отличались друг от друга, и в некоторых случаях они были отрицательными. Но в целом из 114 сенсibilизированных животных, привитых фильтратами, у 18 (15%) появились саркомы.

В качестве контроля были использованы сенсibilизированные, как описано выше, животные, которым вводили экстракты нормальных тканей. Из 67 подобных мышей, переживших 10 месяцев, у одной развилась саркоматозная опухоль.

Из этих и некоторых других опытов и было сделано заключение о том, что вирусный агент может быть обнаружен в «молодых» опухолях, что он только начинает процесс и в дальнейшем после возникновения опухолевых клеток не принимает в нем участия. В связи с этими опытами было высказано также предположение, что химические канцерогенные факторы создают условия для проявления опухолевыми вирусами своей патогенности и что одним из этих условий является наличие быстро пролиферирующих клеток. Предположение о том, что канцерогенные вещества могут провоцировать активность латентных опухолевых вирусов, было высказано рядом авторов. Раус (Rous, 1943), например, думал, что канцерогенные агенты изменяют среду клеток, ассоциированных с вирусом, вследствие чего и возникает вариант вируса, вызывающий опухоль. Оберлэн (Oberling, 1944) высказывал аналогичное предположение.

Необходимо указать, что вышеизложенные опыты весьма доступны критике, особенно с уровня наших теперешних знаний о канцерогенезе. Они были проведены на нелинейных мышах, морфологический контроль был весьма ограниченным, результаты не были достаточно убедительны и допускали различную трактовку. Они, однако, привели к созданию теории, которая получила в дальнейшем многочисленные подтверждения.

Что касается механизма наследственных изменений, вызываемых опухолевыми вирусами, то первоначально мы считали его, как указывалось, аналогичным феномену трансформации бактерий. В последующем, когда благодаря работам Львова (Lwoff, 1953) стало известно, что наследственное вещество фага инкорпорируется с геном бактерии, мы вместе с другими исследователями полагали наиболее вероятным сходный механизм и для процесса наследственного превращения вирусом нормальной клетки в опухолевую. Можно было думать, что клетка изменяется потому, что геном вируса интегрируется с геномом клетки. Дополнительная генетическая информация, привнесенная вирусом в клетку, изменяет происходящие в ней процессы синтеза, создавая опухолевые клетки, размножение которых уже не может регулироваться системами организма, созданными для регуляции нормальных клеток, обладающих отличным от опухолевых обменом.

Важный этап в развитии вирусо-генетической теории — открытие онкогенности нуклеиновых кислот опухолеродных вирусов, хотя оно было сделано вне всякой связи с этой теорией. По меньшей мере для двух вирусов — полиомы и кроличьей папилломы<sup>1</sup> — эту онкогенность можно считать установленной, и есть основания полагать, что чисто методические трудности препятст-

<sup>1</sup> Глава была написана в 1965—1966 гг. (Прим. ред.).

вуют выяснению вопроса об онкогенности нуклеиновых кислот других вирусов. Поскольку нуклеиновые кислоты являются носителями генетической информации, присущей вирусам, появилась возможность изучения механизма превращения нормальных клеток в опухолевые. Первые итоги этого изучения, проведенного с вирусами полиомы, SV40 и Рауса, подтверждают предположение о наличии в малигнизированных клетках генома или части генома этих вирусов.

✓ Существенным для развития вирусно-генетической теории явились также многочисленные факты, полученные при изучении взаимоотношений вируса Рауса и ДНК-содержащих вирусов с клетками млекопитающих, еще раз подтвердившие основное положение вирусно-генетической теории о том, что вирус<sup>1</sup> только начинает процесс и не принимает участия в размножении уже трансформированных клеток. ✓

Эти исследования показали также, что соматические клетки животных менее защищены от инкорпорации в них чужеродной генетической информации, чем клетки половые. Как известно, оплодотворение возможно только между самыми близкими видами. Акт оплодотворения также связан с инкорпорацией новой для данного субъекта генетической информации.

По-видимому, нуклеиновые кислоты вирусов могут редуцироваться и в весьма разнообразных условиях сохранять свои основные функциональные особенности.

Изложенные данные позволяют думать, что для создания опухолевой клетки вовсе не нужен вирус как таковой. Нужна только его генетическая информация, нуклеиновая кислота, взаимодействие которой с геномом клетки происходит на молекулярном уровне. Вирус является только носителем этой генетической информации, и его роль сводится к тому, чтобы доставить ее в клетку (Зильбер, 1961). В соответствии с этим наша концепция и была названа вирусно-генетической. ✓

#### НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ ТЕОРИИ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Громадное количество фактов, полученных при изучении канцерогенеза, естественно, вызвало стремление к их обобщению. За последние годы было сделано несколько подобных попыток. Остановимся на некоторых из них.

Закс (Sachs, 1965) полагает, что две детерминированные вирусом функции могут объяснить основные факты, полученные при изучении канцерогенеза. Эти функции — 1) синтез РНК, которая служит затем матрицей для синтеза раннего белка; 2) ре-

<sup>1</sup> Речь идет о полном инфекционном вирусе (Прим. ред.).

прессия дальнейшего размножения вируса после синтеза этой ранней РНК. Ранний белок и ядерный опухолевый антиген синтезируются примерно в одно и то же время, и это наводит на мысль, что этот антиген и является ранним белком. Можно также предполагать, что ядерный антиген ответствен за синтез трансплантационного антигена. Наличие последнего свидетельствует об изменении поверхности клеток, что может происходить без репликации вирусной ДНК. Синтез вирусного антигена в ядре обусловлен тем, что в ядре происходит синтез вируса.

Предположение о том, что вирусная ДНК непосредственно кодирует синтез опухолевого антигена, объясняет различия в антигенах, индуцированных различными вирусами. Если это предположение правильно, наличие ядерного антигена в опухолевых клетках служит убедительным аргументом присутствия вирусной ДНК в опухолевых клетках. Можно допустить, что количество вирусной ДНК недостаточно, чтобы кодировать все ферменты, нужные для синтеза вируса, поэтому дополнительно требуется индукция клеточных ферментов для этого процесса. Подавление синтеза вируса полиоми при предварительной обработке клеток митомизином может быть объяснено тем, что подобная обработка препятствует синтезу клеточных ферментов, нужных для развития вируса.

Можно допустить, что изменения в клеточных регуляторных механизмах, вызванные изменением клеточной поверхности, влияют на синтез ферментных белков, требующихся как для синтеза вирусной, так и клеточной ДНК. Индукция синтеза клеточной ДНК может происходить без репликации вирусной ДНК.

После синтеза мРНК для ядерного опухолевого антигена может реализоваться другая кодированная вирусом функция — подавление его синтеза. Выражение этой функции приводит к росту опухолевых клеток, в то время как отсутствие этой экспрессии сопровождается дальнейшим размножением вируса и лизисом клеток. В течение роста опухолевых клеток после начальной трансформации может наступить деструкция вирусного генома, но только его часть необходима для поддержания трансформированного состояния.

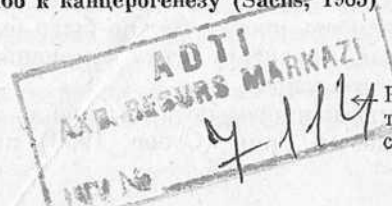
Все эти интересные соображения иллюстрируются следующей схемой:

Последовательность событий в клетке, ведущих либо к развитию вирионов и лизису, либо к канцерогенезу (Sachs, 1965)

Вирусная ДНК

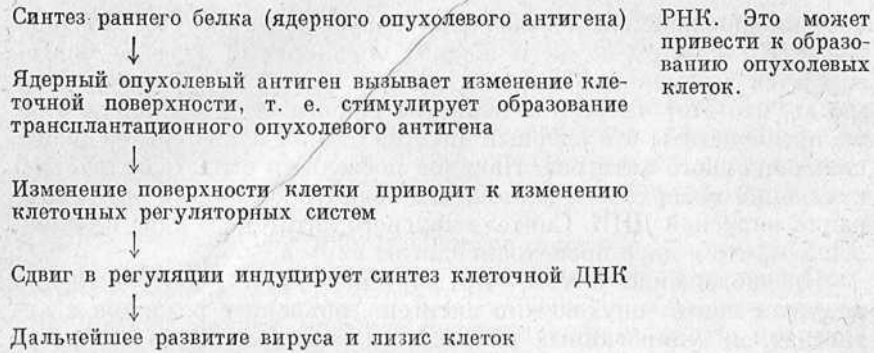


Синтез ранней РНК



Репрессия развития вируса после синтеза ранней





Далее Закс обращает внимание на сходство процессов канцерогенеза, вызываемого малыми ДНК-содержащими вирусами и углеводородами. Показано, что в последнем случае имеет место или лизис клеток, или их опухолевая трансформация. Опухоли, возникающие при этом, имеют новый трансплантационный антиген, но эти антигены индивидуальны в отличие от вирусных опухолей. Однако число индивидуальных антигенов, вероятно, ограничено, и можно ожидать, что изменения поверхности клеток, вызванные вирусом и канцерогеном, в некоторых случаях одинаковы. Имеются сообщения о перекрестных реакциях между вирусными и канцерогенными опухолями.

Можно постулировать, что канцерогенные углеводороды непосредственно реагируют с клеточной поверхностью, вызывая изменения, распознаваемые в качестве трансплантационного опухолевого антигена.

Если изменения в клеточной поверхности под действием канцерогена могут вызывать изменения в регуляторном механизме того же типа, что и вызываемые вирусами, начальные процессы при химическом канцерогенезе также могут быть выражены в индукции клеточных ферментов. Обнаружено, что некоторые клеточные ферменты появляются после воздействия канцерогеном.

Все эти соображения несомненно представляют большой интерес и стимулируют организацию исследований в новых направлениях.

Однако некоторые из предположений Закса не совсем убедительны. Изменения в клетках при химическом канцерогенезе являются наследственными. Трудно представить себе, чтобы воздействием на поверхность клетки можно было бы изменить ее геном, а наследственный характер этих изменений предполагает изменение клеточного генома.

К объяснению канцерогенеза пытались привлечь и иммунологические процессы. Грин (Green, 1958) полагает, что различ-

ные канцерогенные факторы изменяют антигенную структуру клеток. Эти изменения направлены главным образом на типоспецифический клеточный антиген, который при этом становится аутоантигеном. В результате возникает местная иммунологическая реакция на этот антиген. При дальнейшем развитии процесса клетки, лишенные типоспецифического антигена, но имеющие аутоантиген, адаптируются к постоянному действию антител, и возникает новый клон клеток, которые и являются опухолевыми. На значение иммунологических процессов в канцерогенезе указывают также другие исследователи (Сајано, 1958, 1959).

Экспериментальным подтверждением этой теории является факт утраты некоторых органных и тканевых антигенов при малигнизации клеток, установленный Вейлером (Weiler, 1959). Упрощение антигенной структуры гепатом мышей, индуцированных ортоаминоазотолуолом, изучено в нашей лаборатории Г. И. Абеlevым и др. (см. Abelev, 1965). Утрата определенных компонентов клетки, контролирующих ее рост, постулируется также давней теорией «выпадения» (Miller, Miller, 1953; Rusch, 1954), согласно которой канцерогены связываются в клетке с этими компонентами, вследствие чего исчезают из клетки и отсутствуют у ее потомков.

Оценивая иммунологические теории канцерогенеза и теорию выпадения, необходимо сказать следующее. Любая теория канцерогенеза должна исходить из безусловно доказанного наследственного характера изменений клеток, происходящих при неопластическом процессе. Следовательно, она должна указать на агенты, которые вызывают наследуемые (генетические или эпигенетические) изменения в клетках, и пытаться объяснить механизм их действия. Трудно предположить, чтобы разнородные канцерогенные факторы, в том числе вирусы, вызывали потерю или инактивацию одного и того же гена, контролирующего синтез трансплантационного антигена. Относительно некоторых вирусов известно противоположное: они вносят свои гены в клетку, и генетическая информация, представленная ими, кодирует процесс трансформации. При инкорпорации генома вируса или его части клеткой может, по-видимому, иметь место и некоторое изменение присутствующего в клетке генома. Это может повлечь за собой изменение обмена и прекращение синтеза некоторых нормальных антигенов. Иммунологические процессы, происходящие при канцерогенезе, вероятно, возникают не до опухолевой трансформации, а после нее в качестве ответа организма на изменения антигенной структуры, которые происходят при малигнизации.

Обсуждая существующие концепции происхождения рака, Хорсфол (Horsfall, 1963) рассматривает три аспекта раковой проблемы, выдвинутые еще в давних работах Леба (см. Loeb, 1940): роль окружающих факторов, генетических факторов и трансфор-

мации клеток. Он полагает, что основным феноменом в генезисе рака является возникновение нарушений в генетическом материале трансформированных клеток, вызываемое ионизирующей радиацией, химическими соединениями или вирусами. Определение первичного инициатора не является наиболее важным, центральная проблема состоит в определении точной природы ненормальностей в генетическом материале клетки. Определяя рак в химических терминах, можно сказать, что это заболевание молекулярное, обусловленное изменением последовательности нуклеотидов в генетическом материале клетки. В биологических терминах это соответствует индуцированной мутации.

В настоящее время очевидно, что рак обусловлен изменениями генома клеток и что изучение природы этих изменений — наиболее важная проблема. Однако трудно предположить, чтобы изменения, вызванные ионизирующей радиацией, химическими канцерогенами и вирусами, были адекватными. Подобная концепция не объясняет также канцерогенеза, вызываемого немутагенными веществами и воздействиями.

Наконец, мутация, как указывалось выше, представляет собой изменение физиологически присущего клетке генома; при вирусном же канцерогенезе в клетку вносится добавочная генетическая информация, что доказано по меньшей мере для некоторых вирусов, и, следовательно, в данных случаях нельзя говорить о мутации в классическом определении этого понятия.

Ю. М. Оленов (1962) характеризует неопластический процесс как регрессивную эволюцию опухолевых клеток, которая тесно связана с их относительной автономизацией. Он указывает на ряд данных, свидетельствующих об упрощении состава опухолевых клеток по сравнению с нормальными, в частности, на обеднение их антигенной структуры, исчезновение некоторых ферментов и пр., а также на изменение поверхностных свойств опухолевых клеток, предположительно обусловленное исчезновением некоторых белков. Одновременно с этим наблюдается развитие признаков приспособительного характера. Основным фактором регрессивной эволюции является отбор, направленный на усиление регрессивных изменений, выгодных для клетки и обычно невыгодных для организма. Материалом в этом процессе отбора служат эпигенетические изменения. Поскольку дифференцировка клеток в онтогенезе осуществляется при неизменном генотипе, вполне вероятно, по Ю. М. Оленову, что регрессивная эволюция клетки может происходить без участия генома. Однако, как отмечает автор, обнаружение полиплоидных и гетероплоидных клеток в предраковом периоде показывает, что при малигнизации возникают генетические изменения, которые накапливаются в результате отбора. При вирусных опухолях автономизация также обусловлена отбором. Несомненно, отбор является одним из фак-

торов прогрессии опухолей. Но, как правильно указывает автор, предметом отбора является фенотип. При малигнизации же безусловно имеют место наследственные изменения клеток.

По Фолдсу (Foulds, 1958), прогрессия опухоли представляет собой последовательную серию необратимых количественных наследственных изменений. Согласно этому взгляду, этиологический фактор является только стимулятором, который побуждает клетку начать прогрессию к злокачественности.

Наиболее обобщающая концепция канцерогенеза предложена Саутемом (Southam, 1963). На основании анализа обширных материалов, полученных при изучении рака, он приходит к заключению, что опухоли имеют не множественную, а комплексную этиологию, что существуют не просто канцерогенные агенты, каждый из которых вызывает опухоли, а агенты и дополнительные факторы, которые при наличии соответствующих условий или последовательности действия приводят к образованию опухоли. Механизмы, которые увеличивают возможность возникновения рака, могут быть весьма различны и независимы друг от друга. Саутем считает, что иногда можно указать первичные этиологические факторы, которые в других случаях могут быть коканцерогенами. Например, местно действующий химический канцероген повышает канцерогенное действие различных раздражителей и вирусов. В данном случае этот канцероген является первичным этиологическим агентом, а все другие факторы — коканцерогенами. С другой стороны, инфекционность или патогенность вирусов может быть увеличена или изменена вследствие нарушения проницаемости и метаболизма инфицированных клеток или при изменении иммунологической реактивности хозяина, вызванной химикалиями, гормонами, облучением и другими причинами. В этом случае вирус или мутагенный фактор облучения является первичной причиной, а все остальные — дополнительными факторами. ✓

Эта концепция, как отмечает Саутем, весьма близка к концепции, давно уже развиваемой Беренблумом (1959), но не ограничивается, подобно последней, химическим канцерогенезом. Беренблум различает две стадии канцерогенеза — индукцию, или инициацию (initiation), и стадию стимуляции, или активации (promotion). Например, мыши обрабатываются минимальной дозой канцерогенного вещества, которая сама по себе не вызывает опухолей. Через некоторое время кожу мышей смазывают неканцерогенным веществом — кротоновым маслом, поверхностно-активными препаратами и другими, которые играют роль стимулятора. В результате на коже мышей развиваются папилломы. Для осуществления канцерогенеза важен порядок воздействия. Если сначала воздействовать стимулятором, а затем индуктором, то опухоли не возникают. Действие стимулятора, по-видимому,



связано с гиперплазией ткани, которая вызывается большинством из них. Двухстадийный тип канцерогенеза изучен также при экспериментальных лейкозах. Оценивая концепцию Саутема, нужно, конечно, согласиться с ним в том, что многие факторы определяют возможность возникновения опухолей. Но являются ли все эти факторы этиологическими? Правильнее, мне кажется, считать их факторами патогенеза, а не этиологическими.

Этиологическим фактором нужно считать тот агент, без наличия которого данное заболевание не возникает. Например, саркома Рауса может возникнуть только при наличии вируса Рауса, и никакое сочетание других факторов ее не вызывает, хотя многие могут усилить или ослабить возможность ее возникновения. То же следует сказать и о других вирусных опухолях. Кроме того, не все опухолеродные вирусы требуют для проявления своего онкогенного действия дополнительных воздействий, как это отмечено Копровским (Koprowski, 1965).

Для автора этой монографии более приемлема гипотеза, согласно которой существует единая причина возникновения опухолей — вирусы, патогенез же неопластического процесса действительно является комплексным, и реализация патогенности этиологического фактора обусловлена многими причинами. Ранее (Зильбер, 1968) были приведены материалы, указывающие на наличие вирусного генома в опухолевых клетках. Это позволяет думать об аналогии неопластической трансформации и лизогенной конверсии. Однако не все разделяют эту точку зрения.

Согласно Вейлю и др. (Weil et al., 1965), онкогенный эффект вируса полиомы мало сходен с фаговой конверсией в бактериях. Он более сходен с неопластической трансформацией, вызываемой химическими канцерогенами. И в том, и в другом случае потеря цитогенетического равновесия — одно из решающих явлений, обуславливающих прогрессию и селекцию. Этот процесс приводит к появлению возрастающей автономности клеточных вариантов, способных избегать гомеостатического контроля.

Стокер (Stoker, 1966) допускает возможность наличия «hit-and-run»-механизма, при котором вирус может изменить наследственные свойства клетки после единичного контакта с ней и переживание вируса не является необходимым. Он считает, что наибольшая часть генетического потенциала клеток, вероятно, репрессирована. Существуют различные пути, по которым вирус может нарушать существующее равновесие, и тогда начинают «работать» до сих пор «молчавшие» области хромосом. Поэтому нет необходимости в постоянном присутствии генетического материала вируса.

Дефенди (Defendi, 1966) считает маловероятной гипотезу о том, что генетический материал вируса интегрируется с геномом клетки в форме провируса или в эписомной форме и что неопла-

стические свойства клетки зависят от переживания в клетке этого генетического материала. Он полагает, что убедительных результатов о наличии вирусного генома в опухолевых клетках не представлено, а широкий круг морфологических и цитогенетических вариаций в клетках говорит против этой гипотезы.

Более вероятным он считает предположение о том, что вирус вызывает мутацию клеточного генома, аналогичную описанной у MU-1 фага в культуре *E. coli* K12. Возможна также гипотеза, согласно которой вирус вызывает негенетические изменения, которые проявляются в нарушении внутриклеточного кругооборота ферментов, вызывающих индукцию и репрессию.

Дальбекко, внесший ценный вклад в изучение механизма вирусного канцерогенеза, очень осторожно оценивал данные о сходстве этого процесса с лизогенной конверсией и о наличии генома вируса в опухолевой клетке. Он указывал, что в большинстве случаев трансформированные вирусом клетки не иммунны в противоположность лизогенным культурам к повторному заражению и отсутствуют точные доказательства наличия провируса или неполного вируса в трансформированных вирусом полиомы эмбриональных мышинных и хомячковых клетках (Vogt, Dulbecco, 1962). Однако в более поздней работе он пишет: «Некоторые черты, характеризующие трансформацию клеток, вызываемую ДНК-содержащими вирусами, позволяют предполагать, что некоторые из вирусных генов, присутствуя в клетках, продолжают функционировать, в то время как другие не функционируют» (Dulbecco, 1963).

Мне кажется, однако, что данные, свидетельствующие о наличии генома вируса или его части в опухолевых клетках, достаточно серьезны, чтобы с ними считаться<sup>1</sup>. Разумеется, они недостаточны для утверждения, что интеграция генома вируса в геном клетки имеет место во всех случаях, но они достаточны, чтобы предполагать существование подобного механизма.

Что касается аналогии вирусного канцерогенеза с лизогенной конверсией, то трудно было бы ожидать полного совпадения явлений, протекающих, с одной стороны, в бактериальной и с другой — в животной клетке. Но существование этих процессов, заключающееся в интеграции клеткой чужеродного генома, сходно в обоих случаях, и аналогия между этими явлениями вполне отчетлива.

Дальбекко (Dulbecco, 1965) отмечает важность вопроса о том, контролируется ли механизм редупликации вирусной ДНК вирусом или клеткой. Если этот механизм определяется вирусом, то редупликация вирусной ДНК не будет синхронна с редупликацией клеточной ДНК и клетка будет наполняться вирусными про-

<sup>1</sup> Глава написана в 1965—1966 гг. (Прим. ред.).

дуктами и в конце концов погибнет. Этот тип взаимодействия вируса и клетки предлагается назвать «независимым».

Если же механизм редупликации контролируется клеткой, то редупликация вирусной ДНК происходит синхронно с редупликацией клеточной ДНК. В этом случае клетка не повреждается, хотя и претерпевает некоторые изменения. Этот тип взаимодействия обозначается как «зависимый».

Примером независимого типа может служить размножение вируса полиомы в облученных клетках, в которых синтез клеточных ДНК подавлен (Minowada, 1964).

При независимом типе скорость удвоения молекул нуклеиновой кислоты вируса и клетки различна. Например, для ДНК полиомы — 1 час, а для ДНК делящихся клеток животных — 18—24 часа. При независимой редупликации число вирусных молекул возрастает геометрически от одной к двум, четырем, восьми и т. д. При зависимом типе синтезируемая молекула продолжает действовать как матрица и продуцирует копии одну за другой. В этом случае число молекул возрастает: 1, 2, 3 и т. д. Независимый тип характеризуется также динамикой и характером образования клонов. Изучение распределения клонов различной величины, содержащих различное число частиц, может указать на тип процесса.

При зависимом типе нет необходимости в специальных ферментах, так как клеточных энзимов достаточно для осуществления редупликации. При независимом типе отношения другие. Вирусы в этом случае, вероятно, не получают ферменты от хозяйской клетки, а кодируют синтез ферментов, специфичных к данному вирусу; их свойства отличны от свойств ферментов клетки.

Эффект независимой редупликации вируса в клетке имеет разнообразные последствия. Крайняя степень — смерть клетки, главная причина которой — подавление синтеза ДНК, матричной РНК и белков. Это — цитоцидальный тип. Другая степень — никакого вреда для клетки. Это состояние взаимодействия вирус — клетка, названное «равновесным», отличается от носительства вируса тем, что в первом случае все клетки содержат редуплицирующуюся вирусную нуклеиновую кислоту, в то время как во втором случае только небольшое количество клеток содержит ее, и в этих немногих клетках отношения цитоцидальны (Dulbecco, Vogt, 1960). В культурах носителей вируса продукция вируса продолжается благодаря постоянной внешней реинфекции из небольшого количества клеток. При «равновесном» состоянии вирус переносится из клетки в клетку при делении клеток. Внешний перенос возможен, но не существен. Из культуры носителя можно получить клоны свободных от вируса клеток, но это невозможно из «равновесной» культуры. Примером равновесного типа могут служить вирусы лейкозного типа птиц. Скорость синтеза вируса у них

быстрее клеточного размножения. Эти вирусы не подавляют синтеза клеточных ДНК и РНК.

«Равновесное» состояние фундаментально отличается от зависимого тем, что в первом случае вирусный геном не инкорпорируется в клеточные хромосомы. Хорошим примером может служить вирус лимфоматоза кур: передача этого вируса потомству всегда происходит только через самок, хотя все клетки инфицируются у обоих полов (Rubin et al., 1963). Это показывает, что вирусный геном является экстрахромосомальным, вероятно, цитоплазматическим, локализующимся в генеративных клетках. Вирусы, содержащие РНК — независимого типа, ДНК — зависимого. Исключением является вирус Рауса, для которого описано «равновесное» состояние, однако в его синтезе участвует ДНК (Temin, 1964).

#### ВИРУСО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ

Большинство изложенных в предыдущей главе теорий исходит из представлений о том, что этиологические факторы, вызывающие опухоли, являются множественными, что непосредственной причиной возникновения рака и других опухолей могут быть самые разнообразные факторы биологической, физической и химической природы. Все эти теории можно поэтому назвать полиэтиологическими.

✓ В противоположность этому вирусно-генетическая теория — моноэтиологическая. Она постулирует, что при различных формах канцерогенеза причиной возникновения опухолей являются вирусы, а различные физические и химические канцерогенные факторы стимулируют реализацию их онкогенной потенции и являются патогенетическими, а не этиологическими факторами заболевания. ✓

Основные постулаты вирусно-генетической теории происхождения опухолей могут быть сформулированы следующим образом.

1. Естественно возникающие опухоли вызываются вирусами.
2. Опухолеродное действие вирусов на клетки принципиально отличается от инфекционного действия, и процесс вирусного канцерогенеза не является инфекционным.
3. Вместе с тем опухолевые вирусы не отличаются от вирусов, вызывающих инфекционные заболевания, по другим своим свойствам, и их циркуляция в природе подчиняется закономерностям, установленным для инфекционных агентов.
4. Воздействие опухолеродных вирусов на клетки сопровождается изменениями наследственных свойств клеток.
5. Опухолевая конверсия клеток вызывается не вирусом, а его нуклеиновой кислотой. Вирус является только носителем того фактора, который вызывает опухолевую конверсию.



6. Новая генетическая информация, приносимая нуклеиновой кислотой вируса в клетку, инкорпорируется частично или полностью в геном клетки.

7. Наследственные изменения, обусловленные этим процессом, нарушают взаимоотношения между клетками и регулирующими клеточное размножение системами организма, вследствие чего клетки выходят из соподчинения этим последним и возникает нерегулируемое размножение клеток, приводящее к образованию опухоли.

8. Вирус, вызвавший опухолевую конверсию, не принимает участия в размножении уже образовавшихся опухолевых клеток. Опухолевые клетки или совсем не продуцируют зрелого вируса или образуют его неполные (незрелые) формы. В тех же случаях, когда опухолевые клетки продуцируют зрелый вирус, он является «пассажиrom» и не оказывает влияния на рост опухоли.

9. Вопрос о возможном участии вирусов в канцерогенезе, вызываемом химическими и физическими факторами, требует дальнейшего изучения. Имеющиеся данные позволяют предполагать наличие непрямого канцерогенеза.

Материалы, характеризующие основные биологические свойства опухолеродных вирусов и показывающие, что мир этих вирусов весьма обширен, что он включает вирусы с малой и большой онкогенной способностью, с коротким и длительным инкубационным периодом, требующие и не требующие дополнительных факторов для реализации своей патогенности, с малым и большим кругом хозяев, передающиеся разнообразными путями, вирусы различной величины и содержащие разные нуклеиновые кислоты. Но все эти вирусы обладают одним общим для них качеством: они являются возбудителями естественно возникающих спонтанных опухолей животных.

Почти все известные в настоящее время спонтанные опухоли животных — вирусного происхождения. Большинство исследователей считают вирусными и те немногие спонтанные опухоли животных, природа которых еще не вполне точно установлена, например, венерическую опухоль собак. Справедливо полагать, что только методические трудности мешают точному выяснению их этиологии.

Подобные же трудности мешают решению вопроса о происхождении спонтанных опухолей человека. Невозможно предположить, чтобы человек не был подвержен вирусному канцерогенезу, тем более, что трансформация клеток человека воспроизведена при воздействии двух вирусов — SV40 и Рауса.

Если вспомнить, с какими трудностями выяснялась природа некоторых спонтанных опухолей животных, например, рака молочных желез мышей, не будет удивительным, что еще большие трудности встретились при изучении возможной вирусной этио-

логии рака человека. Эти трудности аналогичны тем, которые нужно было преодолеть исследователю, если бы он изучал «безвирусные» опухоли до того, как их вирусная природа была установлена.

✓ Возможно, что клетки опухолей человека содержат провирус, наличие которого может быть обнаружено в специальных, пока еще не известных условиях. Нужно надеяться, что дальнейшее совершенствование методов выделения нуклеиновых кислот и определения их специфичности позволит установить вирусное происхождение опухолей человека. ✓

Серьезное препятствие в получении данных об этиологии опухолей человека заключается в отсутствии возможности проведения опытов на адекватном организме.

✓ Но как бы то ни было, никто не оспаривает сейчас способности вирусов вызывать разнообразные опухоли и широкого распространения опухолеродных вирусов. Эти факты являются достаточным подтверждением вирусной теории происхождения опухолей. Спор может идти только о границах приложения этой теории. До тех пор, пока не будет установлено вирусное происхождение опухолей человека и роль вирусов в канцерогенезе, вызванном различными физическими и химическими факторами, противники вирусной теории всегда будут располагать аргументами, сужающими границы ее приложения. Однако нельзя не видеть, что эти границы расширяются с каждым годом, и, может быть, недалеко то время, когда эти аргументы иссякнут.

Опухолеродные вирусы вступают в самые разнообразные отношения с животными клетками. В одних опухолях вирус синтезируется в уже трансформированных, ставших опухолевыми, клетках, в других — этот синтез не доходит до стадии зрелого вируса и останавливается на стадии провируса. Провирус может существовать в клетках неограниченное время в индуцибельном или неиндуцибельном состоянии. Но во всех случаях, независимо от того, синтезирует опухолевая клетка вирус или нет, (зрелый) вирус не играет роли в дальнейшем течении неопластического процесса после наступившей трансформации. Следовательно, (полный инфекционный) вирус только начинает неопластический процесс, не участвуя в его дальнейших стадиях. Многочисленные доказательства этого постулата вирусно-генетической теории, высказанного еще 20 лет назад, изложены ранее (Зильбер, 1968). Многие исследователи принимают сейчас этот постулат. Например, Дефенди пишет: «Совершенно ясно, что наличие вируса полиомы или SV40 после происшедшей трансформации не играет какой-либо значительной роли в неопластической прогрессии культуры» (Defendi, 1966).

Никем не представлено доказательств противоположной точки зрения. Тот факт, что вирус только начинает неопластический

процесс, вызывая наследственное изменение клеток, и не принимает участия в размножении уже трансформированных опухолевых клетках и прогрессии опухоли, указывает на своеобразие раковой болезни и ее отличие от всех других заболеваний, в том числе и инфекционных.

Другим отличием является то обстоятельство, что клиническая картина заболевания определяется не вирусом, а размножением трансформированных им опухолевых клеток.

Большинство исследователей относят опухолеродные вирусы к инфекционным агентам. Для этого есть серьезные основания, ибо эта группа вирусов по своему строению, химическому составу, способам распространения не отличается от других вирусов, которые вызывают инфекционные процессы. Однако (по своему действию на клетки опухолеродные вирусы резко отличаются от инфекционных. Вирусы, в отличие от бактерий, которые воздействуют на обмен клетки своими токсинами, действуют на клетки посредством своих нуклеиновых кислот. Нуклеиновая кислота инфекционного вируса подавляет синтез клеточного белка и как бы заставляет клетку синтезировать вирусный белок. Нуклеиновая кислота опухолеродного вируса (в случае его опухолеродного действия) не нарушает синтеза белков клетки, этот синтез даже форсируется, и наличие вируса действует на клетку скорее благотворно, чем отрицательно. Синтез вирусных частиц при этом происходит независимо от синтеза клеточного белка, и размножающиеся клетки продуцируют вирус. Однако РНК вируса не только служит матрицей для его редупликации, но и входит в геном клетки, обуславливая ее малигнизацию, возможно, через образование ДНК-содержащего провируса. При ДНК-содержащих вирусах вирус не редуплицируется, и нуклеиновая кислота остается в геноме.

Опухолеродные вирусы, являясь биологическими агентами, вполне сходными с другими вирусами по основным своим свойствам, вызывают не инфекционный, а неопластический процесс. Точнее — они вызывают трансформацию клеток, размножение которых приводит к образованию опухоли. Инфекционное и неопластическое действие вирусов на клетки принципиально различно. Размножение возникших опухолевых клеток происходит в условиях преодоления гомеостатического воздействия организма, вследствие чего в размножающейся популяции трансформированных клеток возникают процессы селекции, приводящие к образованию наиболее злокачественных клонов клеток. Эти и другие изменения, происходящие при образовании опухоли, объединяются общим понятием прогрессии. Изучение прогрессии опухолей весьма важно для понимания неопластического процесса. Однако нельзя ее переоценивать: прогрессия является вторичным процессом, возникающим после происшедшей опухолевой трансформации. Ее

нужно отнести к категории не этиологических, а патогенетических факторов. Механизм прогрессии не имеет ничего общего с механизмом неопластической трансформации, с которой начинается неопластический процесс.

Подавляющее большинство исследователей согласны с тем, что в процессе неопластической трансформации в клетке возникают наследственные изменения.

Необходимо отметить, что взаимодействие генома вируса и генома клетки не остается безразличным для последнего. Клетка, инкорпорировавшая геном вируса, лишается способности синтезировать некоторые антигены, образуемые в норме, и начинает синтезировать новые антигены, кодируемые вирусным геномом. Вместе с тем она продуцирует в некоторых случаях эмбриональные антигены и антигены, присущие другим органам, синтез которых блокирован в норме. Эти изменения или по меньшей мере их часть носят эпигенетический характер.

Таким образом, при неопластической форме взаимодействия в клетке возникают разнообразные генетические и эпигенетические изменения, характер которых обусловлен как вирусом, так и клеткой. Эти изменения составляют основу, на которой разворачивается процесс прогрессии опухоли. Конечный результат всех этих процессов — создание клонов клеток, рост и размножение которых не могут регулироваться соответствующими системами организма, вследствие чего и возникает опухоль. Представляет большой интерес вопрос о стабильности изменений, вызываемых вирусом в клетках.

Априорно можно предполагать, что если существуют условия, при которых клетка инкорпорирует геном вируса, то должны существовать условия, при которых клетка его потеряет. Некоторые экспериментальные данные, как будто, подтверждают подобное предположение. Так, при пассажах хомячковых опухолей, вызванных вирусом Рауса, вирус, присутствующий в первичной опухоли, исчезает на втором-третьем пассаже. Трансплантационный антиген в опухолях, вызванных вирусом SV40, также может исчезать при пассажах. Возможно, что эти изменения обусловлены элиминацией части вирусного генома из клетки. Исследователи несомненно уделяют внимание изучению методов, которые позволят удалить или блокировать ту генетическую информацию, которую приносит вирус в клетку. Вернется ли при этом клетка к своему нормальному состоянию или нет, остается вопросом, подлежащим исследованию, но весьма вероятно, что разработка подобных методов откроет новые пути в изучении и лечении рака и других опухолей.

Изучение интимного механизма генетических изменений в клетках при вирусном канцерогенезе — дело будущего, но самый факт их наличия не вызывает сомнений. Тем самым получает



подтверждение постулат вирусно-генетической теории, согласно которому вирус вызывает в клетке наследственные изменения.

Наиболее сложен и далек от ясности вопрос об участии вирусов в канцерогенезе, вызываемом физическими, химическими и другими невирусными факторами. Вирусно-генетическая теория постулирует это участие, опираясь на данные, изложенные ранее (Зильбер, 1968).

Существование непрямого канцерогенеза можно в настоящее время считать доказанным. Однако в тех случаях, когда неопластическая трансформация вызывается канцерогенным фактором и в возникшей опухоли обнаруживается вирус, нельзя без дополнительных экспериментов решить, является ли этот вирус «пассажиrom», поселившимся в индуцированной канцерогеном опухоли, или этиологическим фактором. Этот вопрос не возникает в тех случаях, когда индукция опухоли вызывается агентом, не обладающим канцерогенной активностью, а в возникшей неопластической ткани обнаруживается специфический онкогенный вирус. Например, никто не думает, что вирус оспенной вакцины может вызывать лейкоз мышей, и приведено достаточно доказательств того, что возникающий при воздействии оспенной вакцины лейкоз на самом деле вызывается латентным лейкозным вирусом.

Как указывалось выше, одним из наиболее существенных возражений против участия вирусов в химическом канцерогенезе является индивидуальность антигенной структуры возникающих при этом опухолей в противоположность общности этой структуры, наблюдаемой при опухолях заведомо вирусного происхождения.

Накапливается все больше данных, показывающих, что многие химические и физические канцерогены воздействуют на генетический аппарат клетки. Но это воздействие лишено закономерности, присущей опухолеродным вирусам. В последнем случае инкорпорация вирусной нуклеиновой кислоты в геном клетки происходит при наличии гомологии данной нуклеиновой кислоты с соответствующим локусом генома клетки, что, по-видимому, и обеспечивает однотипность возникающих изменений. Канцерогенное же вещество может воздействовать на разные цистроны генома клетки, на пути передачи генетической информации, на эпигенетические системы, причем в разных случаях по-разному. Поэтому при совместном действии дополнительной генетической информации, принесенной вирусом в клетку, и канцерогенного вещества картина генетических изменений может быть весьма усложненной и индивидуальной в каждом отдельном случае.

Вполне естественно спросить: не может ли возникнуть канцерогенез без всякой дополнительной генетической информации

только под влиянием воздействия на геном химических и физических факторов? Разумеется, такую возможность нельзя отрицать, и большинство исследователей утверждают, что именно это и происходит при канцерогенезе, вызываемом химическими и физическими факторами.

Мне кажется, однако, несмотря на то что это мнение почти общепринято, его нужно еще доказать так же, как и противоположный взгляд. Опухолеродные вирусы весьма широко распространены в природе, и очень редко в естественных условиях можно найти животное, свободное от вируса. Выше была отмечена удивительная зависимость между частотой спонтанных заболеваний опухолями и легкостью индукции их у данного вида животных химическими канцерогенами. Эта зависимость позволяет предполагать участие вирусов в химическом канцерогенезе, так как спонтанные опухоли являются опухолями вирусного происхождения.

Ранее (Зильбер, 1968) были приведены данные о том, что в канцерогенных опухолях могут быть обнаружены вирусы. Однако в большинстве случаев вирусов в них не находят. Возможно, причиной служит то обстоятельство, что в этих случаях в канцерогенезе участвуют ДНК-содержащие вирусы, образующие «без-вирусные» опухоли.

Конечно, все эти соображения являются умозрительными, и только дальнейшие исследования могут внести ясность в вопрос о возможной роли вирусов в других формах канцерогенеза. Однако для сторонников вирусно-генетической теории на сегодняшний день вполне достаточно и того, что она рационально объясняет канцерогенез, возникающий естественным путем. Отнюдь не будет ее умалением, если будет показана возможность имитации этого процесса искусственно.

Можно указать на некоторые, хотя еще и далекие, практические перспективы вирусно-генетической теории.

Современное лечение рака преследует цель уничтожить или удалить из организма опухолевые клетки воздействием радиации, лекарственными препаратами или хирургическим путем. С позиций вирусно-генетической теории может быть обоснован другой подход к разработке методов лечения рака. Если неопластические свойства клеток обусловлены наличием в них дополнительной генетической информации, целесообразно подумать о возможности удалить ее из клетки или репрессировать. Репрессия некоторых генов клетки (например, кодирующих синтез эмбриональных белков) несомненно происходит в онтогенезе. Изучение ее механизма может помочь найти методы репрессии генетической информации, которая кодирует неопластические свойства клеток. Так как эмбриональный антиген продуцируется гепатомными клетками в культуре и его синтез доступен количественному

определению, эта система является хорошей моделью для изучения возможности репрессии генетических детерминант.)

Нельзя исключить предположение об утрате тех или других генов опухолевой клетки. Некоторые экспериментальные данные говорят о подобной возможности (Macpherson, 1965). Хомячковые клетки, трансформированные вирусом Рауса, образуют колонии в суспензионной агаровой культуре, растут беспорядочно на стекле и вызывают опухоли у хомячков и цыплят. Но экстракты этих культур не вызывали опухоли у цыплят. При клонировании таких культур были обнаружены колонии, морфологически похожие на исходные. Количество клеток, образующих подобные «ревертантные» колонии, возросло в одной культуре с 5,5 до 19% через три недели и до 98% через восемь недель. Подобное возрастание наблюдалось и в других субклонах. «Ревертантные» колонии не вызывали опухоли у цыплят. Автор этой работы полагает, что реверсия может быть обусловлена частичной или полной потерей генома вируса Рауса клетками культуры. Однако можно с полной убедительностью исключить предположение о том, что трансформированные клетки в силу каких-то причин размножились в культуре более интенсивно.

Если какая-то часть генома может утрачиваться «спонтанно», весьма вероятно возможность воспроизвести этот процесс искусственно.

Следовательно, разрабатывая новые принципы лечения рака, нужно думать не только о блокировке дополнительной генетической информации, привносимой вирусом, но и об ее удалении или разрушении.

Другие возможные пути практического использования вирусогенетической теории лежат в области иммунологии рака. Мы обсуждали эту проблему в другой работе (Зильбер, Абелев, 1962). Согласно вирусогенетической теории, в организме, пораженном опухолью, возникают два различных ответных процесса — ответ на вирус и ответ на опухоль. Механизмы эти разные, и организм, иммунный к вирусу, не иммунен к опухолевым клеткам. Отсюда следует, что профилактическая иммунизация против опухолей человека станет возможной только тогда, когда в руках исследователя будут вирусы, ответственные за возникновение этих опухолей.

Подобная вакцинация вполне осуществима в настоящее время в отношении большинства спонтанных опухолей животных.

Иначе обстоит дело с иммунизацией против метастазов и рецидивов опухолей, которые вызываются уже не вирусом, а опухолевыми клетками. В этом случае важно создать иммунитет не к вирусу, а к опухолевым клеткам, что и возможно в отношении многих опухолей животных. Весьма вероятно, что это возможно и в отношении опухолей человека путем иммунизации

раковых больных после произведенных операций антигенами раковых клеток. В некоторых исследованиях (Зильбер, 1958; Southam, 1965) продемонстрировано наличие подобных антигенов, и изучение возможности их использования для профилактики рецидивов опухолей и развития метастазов вполне обоснованно.

Предпосылкой для этих исследований является выделение и концентрирование опухолевых антигенов. Если это будет достигнуто, возможно, что очищенные и концентрированные опухолевые антигены будут полезны и в диагностике неопластических заболеваний. Однако эти практические перспективы могут быть реализованы только в условиях дальнейшего прогресса в разработке теории канцерогенеза. Главнейшая задача в этой области заключается в установлении конкретных биохимических процессов, регулирующих активность генома опухолевой клетки. В конце концов рак — это заболевание генома клетки, и вполне естественно ожидать успехов в лечении этого заболевания тогда, когда будут изучены процессы, определяющие и регулирующие нормальное и патологическое функционирование клеточного генома. Это — задача биохимии и молекулярной биологии.

В истории изучения опухолей можно отметить периоды, когда это изучение велось под доминирующим влиянием ученых определенной специальности. Вначале это были патологи, затем генетики и иммунологи, в последние годы вирусологи. Конечно, это доминирование не было абсолютным. Сейчас эстафета должна находиться в руках биохимиков. Именно от них можно ожидать выяснения молекулярных процессов, которые приводят к заболеванию генома клетки, клинически проявляющемуся в образовании опухоли. И от них можно ожидать разработки методов, которые будут препятствовать этому заболеванию и, возможно, лечить его.



## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВИРУСО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕОРИИ

---

За последние годы был полностью доказан интеграционный тип взаимодействия онкогенного вируса с клеткой. Прямыми экспериментами при помощи как физических, так и генетических методов продемонстрирован геном онкогенного вируса в интегрированной форме в геноме опухолевой клетки. Эти данные подтвердили правильность основных положений вирусно-генетической теории и явились результатом всестороннего биологического и молекулярно-биологического изучения как самих онкогенных вирусов, так и клеточных систем, служащих мишенями трансформирующего или инфекционного действия этих вирусов.

К числу кардинальных проблем и вопросов, которые мы считали необходимым рассмотреть и обобщить, следует отнести:

1. Выделение новых как ДНК-, так и РНК-содержащих онкогенных вирусов и детальное изучение их свойств, путей распространения и форм взаимодействия как на уровне клетки, так и на уровне организма.

2. Выделение и изучение термочувствительных мутантов онкогенных вирусов; использование этих мутантов позволило выявить отдельные вирусные гены, непосредственно определяющие интеграцию и опухолевую трансформацию клетки.

3. Интеграция генома онкогенного вируса в геном опухолевой клетки; определение точного количества полных вирусных геномов или идентификация участков вирусного генома в геноме опухолевой клетки.

Этиологическая роль вирусов группы герпеса в природном канцерогенезе и возможность существования новых форм интеграционного взаимодействия геномов вируса и клетки.

4. Обнаружение обратных транскриптаз у онкорнавирусов; существование принципиально нового пути передачи генетической информации с вирусной РНК в ДНК-провирус и как следствие этого обнаружение такой вирусспецифической ДНК в составе клеточного генома.

5. Существование различных форм и типов экспрессии интегрированного вирусного генома.

6. Обнаружение в геноме нормальных клеток генома онкорна-

вирусов; возможность индукции в таких клетках химическими и биологическими агентами полных форм онкорнавирусов.

Авторы далеки от мысли представить в этой книге обширнейший материал, накопленный при изучении природы рака различными методами. Здесь приведены только те из них, которые имеют отношение к вирусно-генетической теории, главным образом к интеграционному взаимодействию геномов онкогенного вируса и нормальной клетки и механизму этого взаимодействия.

В книге не приведены материалы по иммунологическим аспектам злокачественного роста, так как мы полагали невозможным излагать эту громадную и совершенно самостоятельную проблему как часть какой-либо монографии.

---

## Глава вторая ДНК-СОДЕРЖАЩИЕ ОПУХОЛЕРОДНЫЕ ВИРУСЫ

В список онкогенных вирусов мы включили все те известные к настоящему времени вирусы, которые при введении их животным вызывают у них какие-либо злокачественные или доброкачественные новообразования. При этом нужно учитывать всю относительность этого определения. Способность вируса вызывать опухоль зависит от многих причин и в частности: 1) от дозы вируса; низкие дозы даже высокоонкогенного вируса, ниже одной онкогенной дозы, которая может значительно превышать инфекционную, не вызовут опухоль даже у высокочувствительного животного; 2) от вида животного, его генотипа и физиологического статуса. Громадные дозы вируса, вызывающего опухоли молочных желез у мышей, не вызовут опухоль у хомячка, даже при многократных введениях вируса новорожденным; чувствительность мышей разных линий к одной и той же дозе вируса лейкоза Раушера варьирует от 0 до 100%. Многочисленные примеры роли гормональных или иммунологических факторов в вирусном канцерогенезе широко известны. Так, общим правилом при исследовании онкогенных свойств вирусов стало использование новорожденных или тимэктомированных животных. Детально все эти факты многократно приводились и обсуждались во многих исчерпывающих обзорах и монографиях, и мы не будем подробно останавливаться на этом. Мы дадим лишь краткую характеристику свойств разных групп онкогенных вирусов (см. подробно Gross, 1970; Green, 1970; Temin, 1971; Tooze, 1973; Зильбер, Абелев, 1962; Агеенко, 1969, 1974; Бергольц, 1973).

История открытия разных онковирусов и полный список литературных источников и оригинальных публикаций приведены в книгах Л. А. Зильбера (1968), Гросса (Gross, 1970) и Тузе (Tooze, 1973).

Четыре группы ДНК-содержащих вирусов имеют в своем составе онкогенных «представителей»: 1) вирусы группы Радова, 2) аденовирусы, 3) вирусы группы герпеса и 4) вирусы группы оспы. Таким образом, только одна группа из известных сейчас ДНК-содержащих вирусов — группа Parvo (пикодна) — мелких,

резистентных к эфиру с кубическим типом симметрии и однонитчатой молекулой нуклеиновой кислоты — не имеет своих представителей в семействе онкогенных вирусов (см. Andrewes, Pereira, 1972).

#### ВИРУСЫ ГРУППЫ PAVOVA

Мелкие ДНК-содержащие вирусы с кубическим типом симметрии, резистентные к эфиру и нагреванию при 56°; условно их делят на две подгруппы: подгруппу папилломатозных вирусов (или Papovavirus A) и подгруппу вируса полиомы — SV40 или Papovavirus B. Обе подгруппы характеризуются единым типом строения: вирион состоит из ядра, содержащего ДНК, и белковой капсулы, его окружающей, построенной из идентичных субъединиц (капсомеров). Сам вирион — «голый» (не имеет наружной мембраны), икосаэдральной формы. Созревание вирионов происходит в клеточном ядре (Melnick et al., 1974; Green, 1970).

#### *Подгруппа папилломатозных вирусов*

В эту подгруппу входят вирусы, вызывающие доброкачественные папилломы кожи и слизистой у своих природных хозяев — золотистых хомячков, сусликов, кроликов (вирус папилломы Шоупа), опоссумов, кошек, собак, овец, коз, оленей («фиброма» оленей), крупного рогатого скота (фибронипиллома), лошадей, обезьян и человека (см. подробно Gross, 1970; Green, 1970; Melnick et al., 1974). Как правило, патогенность этих вирусов ограничена их природным хозяином. Исключение составляют вирус папилломы крупного рогатого скота (он вызывает при лабораторном заражении фибромные опухоли у мышей, хомячков и лошадей — см. Robl et al., 1972) и, возможно, вирус папилломы Шоупа (Нагаева, 1966). Имеются данные о том, что вирус папиллом крупного рогатого скота является и этиологическим агентом опухолей мочевого пузыря коров. Интересно, что в случае папилломы крупного рогатого скота так же, как и при фиброме оленей, помимо папилломатозных разрастаний эпителия, обнаружена интенсивная пролиферация соединительной ткани — может быть, с этой тканевой полипотентностью и связан широкий спектр патогенности вируса папилломы крупного рогатого скота.

Не исключено, что разные типы папиллом или бородавок у одного и того же вида животных вызываются разными типами папилломатозных вирусов (см. подробно Gross, 1970; Melnick et al., 1974; Green, 1970).

Вирусы папиллом имеют размеры около 55 нм и построены из 72 капсомеров. Плавающая плотность вирионов в градиенте CsCl — 1,29—1,34 г/мл, коэффициент седиментации около 300S. Вирус



Шоупа и вирус папилломы человека содержит около 420 белковых субъединиц; при этом различают в их составе один основной белок с молекулярным весом около 60 000 дальтон и 5—6 минорных.

Двуспиральная ДНК в форме суперциркулярной ковалентно-замкнутой молекулы с молекулярным весом около  $5 \cdot 10^6$  дальтон (28S) составляет 12% от веса вириона. Содержание Г+Ц в вирусной ДНК — 41% для папилломы человека, 43% для папилломы собак, 45% для папилломы крупного рогатого скота и 47% для папилломы кролика (см. Melnick et al., 1974).

Отсутствие адекватных систем для размножения папилломатозных вирусов *in vitro* сильно тормозит процесс изучения свойств и особенностей этих вирусов. Наиболее изученные из них — вирус папилломы (бородавок) человека и вирус кроличьей папилломы (вирус Шоупа). Последний является классической моделью онковирусологии с момента своего открытия, и многими кардинальными фактами онковирусология и экспериментальная онкология обязаны этому вирусу: сюда можно включить прогрессию свойств опухолевой клетки, взаимодействие вирусных и химических факторов в канцерогенезе, маскировку или исчезновение вируса при «трансформации» доброкачественной опухоли в злокачественную, взаимосвязь созревания вируса и дифференцировки клетки и т. д.

Для большинства вирусов папиллом характерен не только узкий спектр чувствительных животных, но и узкий цитотропизм — так, вирус Шоупа вызывает опухолевую трансформацию только эпителиальных клеток кожи. При этом зрелые вирусные частицы не удается обнаружить в быстро пролиферирующих клетках базального слоя папилломы (хотя инфекционная ДНК вируса обнаруживается). Лишь в ядрах дифференцированных кератинизированных наружных клеток папилломы можно обнаружить полные инфекционные вирусные частицы. Зрелый вирус папилломы не удается обнаружить в злокачественных карциномах, возникающих из вирусных папиллом на 4—9-м месяце их роста примерно в 25—75% случаев (в зависимости от вида кроликов — домашние или дикие) (см. Gross, 1970; Зильбер, 1968).

Не найдено антигенного сходства между различными членами этой подгруппы; кроме вируса папилломы крупного рогатого скота (Favre et al., 1974), у них не обнаружено гемагглютинирующих свойств [хотя адсорбция вируса папилломы Шоупа эритроцитами кролика была показана Л. А. Зильбером и др. (1953)] или способности к цитопатогенному действию в культуре ткани. Получение удобной системы *in vitro* безусловно откроет новую страницу в истории изучения этих вирусов — одной из самых интересных моделей вирусного канцерогенеза. Этому, конечно, в немалой степени будет способствовать возможность приложе-

ния всего мощного арсенала молекулярной биологии, который так плодотворно используется, например, для вируса полиомы и SV40. Наверняка тогда получит детальное объяснение и такой интересный факт, как ингибирование вируса папилломы Шоупа экстрактами кроличьей карциномы (см. Зильбер, Артамонова, 1954).

Сравнительно недавно у вируса Шоупа была обнаружена способность индуцировать синтез специфической аргиназы у кроликов и других животных, включая человека. Эти данные имеют практический интерес в связи с возможностью лечения вирусом наследственного заболевания людей — аргининемии (см. подробно Rogers et al., 1973).

#### *Подгруппа вируса полиомы — SV40*

Эта подгруппа включает в себя вирус полиомы — природный хозяин мышь, SV40 — природный хозяин обезьяна *M. rhesus*, К-вирус мышей, вирус вакуолизирующей почки кролика, и недавно выделенные вирусы лягушек, свиней и человека (см. Melnick et al., 1974). Онкогенные свойства обнаружены у трех представителей этой подгруппы — вируса полиомы, SV40 и вирусов человека. При этом онкогенность вируса SV40 удалось обнаружить только в лабораторных условиях у неприродных хозяев — хомячков, мастомис, крыс. У своего природного хозяина *M. rhesus* или у других видов обезьян он не вызывает каких-либо патологических изменений.

Вирус полиомы онкогенен и вызывает множественные опухоли при лабораторном заражении своего природного хозяина — мыши; его онкогенность доказана и для шести различных видов млекопитающих (хомячки, крысы, мастомис, морские свинки, кролики, хорьки). Однако в «спонтанном» канцерогенезе у мышей роль вируса полиомы на удивление мала: по подсчету Гросса лишь у одной из 5000 мышей «спонтанно» возникает наиболее характерная для вируса полиомы опухоль — карцинома слюнной железы.

Мыши разных линий резко отличаются по своей чувствительности к онкогенному действию вируса полиомы. Генетическая резистентность при этом не обусловлена нечувствительностью клеток-мишеней, а связана с действием иммунных факторов, главным образом, клеточных (см. подробно Gross, 1970; Melnick et al., 1974).

Наиболее изучены свойства двух представителей этой подгруппы — вируса полиомы (PV) и вируса SV40. По существу этим двум вирусам мы обязаны современному пониманию многих вопросов вирусного канцерогенеза.

Вирусы PV и SV40 содержат ковалентно замкнутую двунитевую суперциркулярную ДНК, которая составляет около 12% от

веса вириона. Молекулярный вес ДНК равен примерно  $3 \cdot 10^6$  дальтон (21S); содержание Г+Ц в молекуле ДНК — 48% для РУ и 41% для SV40. Вирионы РУ и SV40 построены из 72 белковых капсомеров. Из них 12 содержат по 5 субъединиц и 60 содержат по 6 субъединиц, что хорошо согласуется с размерами основного белка вириона (VP-1; мол. вес этого белка для обоих вирусов — примерно 47 000). Плавающая плотность полных вирионов РУ и SV40 в градиенте CsCl составляет 1,34 г/мл, коэффициент седиментации — 340S, размер — около 45 нм.

Белковый состав вирионов РУ и SV40 достаточно хорошо изучен. Вирионы РУ содержат три основных белка; VP-1, VP-2 и VP-3 с молекулярным весом соответственно 47 000, 35 000 и 23 000 дальтон. В последнее время появились данные о том, что ДНК вируса кодирует синтез лишь одного вирионного белка VP-1, а два других являются продуктами «резки» его; для SV40 мол. вес VP-1 равен 46 000, VP-2—30 000 дальтон. В составе обоих вирусов найдено еще три минорных гистоноподобных белковых компонента: VP-4, VP-5 и VP-6 с мол. весом соответственно 14 000, 13 000 и 12 000 дальтон; показано, что VP-4—VP-6 являются компонентами клетки. Суммарный молекулярный вес всех этих белков от VP-1 до VP-6 включительно, примерно 115 000 (SV40) или примерно 144 000 (РУ), что хорошо согласуется с кодирующими «возможностями» генома: мол. вес ДНК SV40— $3,4 \cdot 10^6$  дальтон, т. е. ДНК содержит 5500 пар оснований, и, следовательно, суммарный молекулярный вес белка, который может кодировать такая ДНК, не должен превышать 200 000 (см. Crawford, 1973).

В составе вирионов РУ и SV40 обнаружен также один фермент — эндонуклеаза, который может играть роль в процессе интеграции вируса в геном клетки (Kaplan et al., 1972; Greenaway, 1973).

Вирус полиомы обладает гемагглютинирующими свойствами, у вируса SV40 эта способность не обнаружена. Вирусы РУ и SV40 полностью антигенно различны; метод гибридизации ДНК—ДНК не позволил обнаружить комплементарных нуклеотидных последовательностей в ДНК у этих двух вирусов, впрочем так же, как и с вирусом папилломы Шоупа. В то же время по последовательности оснований, определяемых с помощью техники «ближайших соседей» ДНК вируса полиомы и SV40, в отличие от «крупных» неонкогенных вирусов, оказались сходны с ДНК клеток млекопитающих (см. Green 1970; Melnick et al., 1974).

Инфекция этими двумя вирусами широко распространена у их природных хозяев в форме латентного, бессимптомного носительства на протяжении всей жизни животного; с этим связано и частое обнаружение нейтрализующих антител к этим вирусам у их природных хозяев. Инфицирование происходит в постнаталь-

ном периоде. Основные источники вируса — слюна, моча и другие экскреты (Rowe, 1961).

При инфекции клеток *in vitro* РУ и SV40 возможны три основных варианта взаимодействия: при заражении клеток природного хозяина имеет место, главным образом, продуктивная инфекция, сопровождающаяся развитием и созреванием вируса в ядре с последующим выходом его в цитоплазму и гибелью клетки. При этом очень часто в ядре формируется вирусный «кристалл». Такая клеточная система, в которой происходит продуктивная инфекция и конечным результатом которой является образование инфекционного потомства, носит название перmissive (разрешающей) системы. Опухолевая трансформация перmissive клеток природного хозяина при инфекции РУ и SV40 — событие чрезвычайной редкости; необходимы специальные условия — наличие дефектных вирионов, быстрые клеточные пассажи и т. д. — для того, чтобы получить трансформацию клеток природного хозяина этими вирусами.

При инфекции клеток неприродного хозяина, как правило, продуктивной инфекции РУ или SV40 не происходит. Система по этому свойству является неpermissive (не разрешающей). Инфекция в этом случае ведет или к временному проявлению некоторых вирусспецифических функций, которые затем бесследно исчезают, — abortивная инфекция, или же итогом такой инфекции является опухолевая трансформация клетки, при которой также не происходит продуктивной инфекции. Лишь часть вирусспецифических функций реализуется в процессе инфекции неpermissive клеток РУ или SV40. Трансформация и продуктивная инфекция для этих вирусов являются взаимоисключающими событиями (Зильбер, 1968; Green, 1970). Ниже мы приведем факты (см. главу 4), связанные с феноменом трансформации клеток *in vitro* онкогенными вирусами. Здесь коротко укажем, что трансформация клеток РУ или SV40 состоит в появлении в инфицированной однослойной культуре ткани морфологически измененных клеток, характеризующихся многослойным ростом. При подборе определенных типов клеток, условий инфекции и культивирования их, можно получить единичные, дискретные очаги многослойного роста клеток — «фокусы» трансформации. Каждый такой «фокус» трансформации — результат роста одной трансформированной клетки — и, следовательно, этот феномен позволяет количественно оценивать трансформацию в «фокус-образующих» единицах (ФОЕ) вируса. Онкогенность трансформированных клеток доказана введением их гомологичному или изологичному животному.

Продуктивная или abortивная инфекция клеток РУ или SV40 ведет к появлению в инфицированных клетках новых вирусспецифических антигенов; обнаруживаемого в ядре так называемого



Т-антигена, «раннего» белка, кодируемого ДНК вируса. Т-антиген не входит в состав зрелого вириона (невирионный антиген), и функция и роль его в инфицированной клетке точно не известны. Синтез вирусной ДНК не нужен для индукции синтеза Т-антигена. Молекулярный вес Т-антигена SV40 — 70 000 дальтон (Crawford, 1973). Недавно получены данные, что Т-антиген SV40 обладает эндонуклеазной активностью (Шляпкевич и др., 1975). Если эти данные будут подтверждены, то функции Т-антигена в процессе инфекции станут более понятными. Интересно, что Карол и др. (Carroll et al., 1974) обнаружили высокое сродство Т-антигена к молекуле двуспиральной ДНК.

Т-антиген постоянно синтезируется также в ядрах опухолевых и трансформированных клеток. «Ранняя» природа этого антигена связана с индукцией его в клетке до появления синтеза вирусной ДНК РУ или SV40. Т-антигены SV40 и РУ — антигенно различны, но абсолютно специфичны для индуцирующего их вируса.

На поверхности опухолевых или трансформированных РУ или SV40 клеток обнаружен другой вирусспецифический невирионный клеточный трансплантационный антиген (TSTA — Tumor specific transplantation antigen). Природа этого антигена изучена еще недостаточно. Он является, так же как и Т-антиген, основным иммунологическим маркером специфичности вирусной трансформации, выявляемой в трансплантационном тесте (феномен резистентности), и определяющим объектом иммунной реакции организма на опухоль, индуцированную ДНК-содержащими вирусами. Все вирусы группы Рарова индуцируют свой характерный, вирусспецифический для данного вируса TSTA (Радзиховская, 1971; Дейчман, 1969).

TSTA индуцируется и в процессе продуктивной инфекции клетки РУ и SV40 и, возможно, является проявлением также ранней функции вирусной ДНК (Ирлин, 1967; Kluchareva et al., 1967). Эти данные, а также целый ряд других фактов, которые будут приведены в соответствующих разделах, показывают, что начальные этапы трансформации и продуктивной инфекции идентичны, и, возможно, трансформация — один из необходимых этапов полного цикла взаимодействия вируса с клеткой.

Кроме этих двух вирусспецифических невирионных антигенов, в процессе продуктивной инфекции или в трансформированной клетке обнаружены и другие антигены, отсутствующие в неинфицированной клетке. Это — поверхностные эмбриональные антигены, антиген Форсмана и другие являются вирусиндуцируемыми, но, по-видимому, не вирусспецифическими антигенами; роль и природа этих антигенов изучены недостаточно (см. Tooze, 1973).

Свойства вирусов РУ и SV40 к настоящему времени хорошо изучены. Изучена и их роль в индукции опухолей у экспери-

ментальных животных, и патогенез этих опухолей. По существу биология вирусов РУ и SV40 — это, по крайней мере на современном уровне, уже законченная глава онковирусологии. Тем больший интерес привлекают сейчас «новые» вирусы этой группы, вирусы, выделенные недавно непосредственно от людей, в частности, от больных своеобразной болезнью соединительной ткани мозга — прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатией (ПМЛ).

Еще в 1965 г. Цу Рейн и Шоу (см. Zurhein, 1969) при электронномикроскопическом исследовании мозга больных ПМЛ обнаружили вирусные частицы, сходные с вирионами группы Рарова. ПМЛ — димелинизирующее заболевание центральной нервной системы, часто сопровождающееся (примерно в 50% случаев) опухолями (лимфосаркома, хроническая лимфатическая лейкемия, болезнь Ходжкина, хроническая и острая миелоидная лейкемия, карциноматоз) и другими хроническими заболеваниями (туберкулез, саркоидоз). Большинство больных ПМЛ (в связи с этими сопутствующими заболеваниями) получали те или иные иммунодепрессанты. ПМЛ характеризуется образованием множественных очагов деструкции миелина и гиперцеллюлярных фокусов роста олигодендроглии. Вирионы типа SV40 и РУ обнаруживались лишь в гниущих клетках; клетки гиперпластических фокусов роста вирионов, как правило, не содержали (Zurhein, 1969).

Из мозга больных ПМЛ в 1971—1973 гг. было выделено несколько штаммов вирусов, морфологически идентичных вирусам SV40 и РУ: JC (Padgett et al., 1971), PML-1, PML-2 (Weiner et al., 1971), однако «монотропность» таких РУ- и SV40-подобных вирусов по отношению к мозгу больных ПМЛ людей не подтвердилась. В 1971 г. Гарднер и др. (Gardner et al., 1971b) из мочи людей с трансплантатами почки выделили вирус (штамм ВК), морфологически также идентичный SV40 и РУ. (Интересно, что у таких людей был очень высок процент появления бородавок.) Впоследствии факт обнаружения и выделения РУ- и SV40-подобных вирусов из мочи людей с почечным трансплантатом был неоднократно подтвержден (Lecatsas et al., 1973; Coleman et al., 1973; Dougherty, Distefano, 1974). Все такие больные получали интенсивную иммунодепрессантную терапию, которая, по-видимому, является одним из решающих факторов активации этого вируса (Shah et al., 1974).

Все выделенные штаммы по структуре и размерам вирионов, их физико-химическим свойствам, характеру размножения в чувствительной клетке и физико-химическим свойствам ДНК, т. е. по основным классификационным признакам, были идентичны вирусам РУ и SV40 (см. Dougherty, Distefano, 1974).

Сейчас можно выделить несколько серотипов SV40- и РУ-подобных вирусов людей: ВК — основной источник выделения моча

людей с почечным трансплантатом и JC — основной источник выделения мозг людей, больных ПМЛ. Штаммы, описанные Вейнером и др. (Weiner et al., 1972) — PML-1, PML-2, также выделенные из мозга больных ПМЛ, как серологически, так и по многим другим свойствам крайне близки вирусу SV40 (Martin et al., 1974; Sack et al., 1973). В то же время штаммы JC и BK так же, как и PУ, обладают гемагглютинирующими свойствами. Однако все изученные в настоящее время штаммы SV40-подобных вирусов человека антигенно совершенно отличны от вируса полиомы. Штаммы, выделенные от больных ПМЛ, имеют общий с SV40 Т-антиген, при этом штаммы PML-1 и PML-2 имеют сходный с SV40 вирионный антиген и, естественно, нейтрализуются антисыворотками к SV40. Однако идентичность эта, по-видимому, не полная.

Штамм JC, также выделенный от больных ПМЛ, дает слабую перекрестную нейтрализацию с SV40. Вирус BK полностью отличен по вирионным антигенам от SV40, но Т-антиген BK дает слабую перекрестную реакцию с Т-антигеном SV40. Вирионные антигены BK и JC полностью отличны друг от друга.

Следовательно, несмотря на значительные антигенные различия по антигенам вирионов, все описанные штаммы SV40-подобных вирусов человека имели идентичный или сходный с SV40 Т-антиген. Нет общих антигенов у этих вирусов с вирусами папиллом кроликов и человека.

По своим культуральным свойствам человеческие вирусы группы Рарова также отличаются друг от друга: штаммы PML-1, PML-2 практически идентичны вирусу SV40, хотя и дают в клетках человека более высокий урожай, чем SV40; штамм BK в обезьяньих клетках размножается очень плохо. Для JC перmissive системой являются, по-видимому, только клетки человека. Штамм PML-2, антигенно сходный с SV40, оказался очень близок к SV40 и при сравнении ДНК — ДНК гибридизации. Из 11 фрагментов ДНК PML-2, полученных обработкой ДНК вирионов этого штамма рестриктазой *H. influenzae*, 9 были идентичны фрагментам SV40. Все это говорит о том, что штамм PML-2 является вариантом вируса SV40 (Shah et al., 1973). Сравнение этим же методом штаммов JC и BK (Osborn et al., 1974) показало значительное отличие их друг от друга и полное отличие от SV40 (см. подробно Takemoto et al., 1974).

Все изученные штаммы SV40-подобных вирусов человека оказались онкогенными для хомячков. В зависимости от способа введения вируса новорожденным животным они индуцировали недифференцированные саркомы или папилломы сосудистого пучка и глиобластомы мозга (Walker et al., 1973; Nagayan, Weiner, 1974). Вирус BK вызывает злокачественную трансформацию хомячковых клеток и *in vitro* (Major, Dimayorca, 1973).

В клетках хомячковых опухолей, индуцированных штаммами PML, обнаружен ядерный Т-антиген, серологически идентичный Т-антигену SV40 (Narayan, Weiner, 1974).

Нейтрализующие антитела к вирусу ВК обнаруживаются примерно у 80% здоровых людей (Shah et al., 1973; Gardner, 1973) в Европе и США. У трехлетних детей антитела обнаруживались в 50% случаев и у 10—11-летних — в 100% случаев. Антитела к штамму JC также обнаруживаются примерно у 80% обследованных, но появляются они несколько позже — с 10—14-летнего возраста.

Вирусы этой группы широко распространены во всем мире: действительно, антитела к ним были обнаружены в Англии (Gardner, 1973), США, Северной Африке (Lecatsas et al., 1973).

В ряде случаев у больных с трансплантатами почек можно обнаружить и антитела к Т-антигену вируса ВК (Shah et al., 1973).

Серологические данные, полученные с ВК, JC и аналогичными вирусами, разительно напоминают всю сероэпидемиологию полиоминой инфекции у мышей, столь подробно изученную и описанную Роу и его сотрудниками (см. подробно Rowe, 1961).

Обнаружение SV40-подобных вирусов у человека, естественно, поднимает целый ряд вопросов, связанных с патологией и болезнями человека. Какова природа и происхождение этих вирусов — являются ли они типами *sui generis* или это мутанты или варианты вируса SV40, который был искусственно введен детям при вакцинации против полиомиелита? Иммунологические данные и данные молекулярной биологии в случае вирусов JC и ВК говорят скорее о первой возможности; в случае же штаммов PML и сходных с ними можно говорить об очень большом сходстве между этими вирусами и вирусом SV40. Однако даже у людей, вакцинированных против полиомиелита, антитела к SV40 обнаружены только в 4%. Характерно, что штамм ВК (да и другие штаммы) удается выделить главным образом у больных, получавших иммунодепрессантную терапию. В опытах Аллисона и др. (Allison, 1974) у мышей, латентно или природно инфицированных вирусом полиомы, после интенсивных иммунодепрессивных воздействий, в 100% случаев возникали полиомные опухоли. Уместно напомнить также, что у больных с аллотрансплантатами почек (и с сопутствующей иммунодепрессантной терапией) количество опухолей резко возрастает главным образом за счет лимфом и ретикулоэпителиальных сарком — в 35 и 350 раз соответственно (Hoover, Fraumeni, 1973). Количество опухолей кожи и губы увеличивается в 4 раза, сарком мягких тканей и гепатобиллиарных карцином — в 2,5 раза. Возможность того, что эти вирусы играют роль в этиологии опухолей человека вполне вероятна. Это положение подчеркивает и тот факт, что Диамандопулос (Diamandopoulos



los, 1972) при внутривенном введении вируса SV40 хомячкам получил у них лейкемии, лимфомы и остеосаркомы.

Вирус SV40 и Т-антиген вируса SV40 были обнаружены недавно в клетках метастазов меланомы человека (Soriano et al., 1974). При ретроспективном анализе заболеваемости различными опухолями людей, переживших атомную бомбардировку, наряду с резким повышением частоты лейкемии было обнаружено 5-кратное повышение частоты опухолей слюнных желез. Это весьма напоминает «онкогенную ситуацию» у облученных мышей: значительное повышение числа заболеваний лейкемии и опухолей слюнных желез, вызванных соответственно вирусом лейкоза Гросса и РУ (см. Gross, 1972).

В 3 из 7 менингиом человека, в клетках которых обнаружена утрата одной хромосомы, G-22, обнаружен ядерный антиген, идентичный Т-антигену SV40. Инфекционный вирус в гетерокарионах индуцировать не удалось (Weiss et al., 1975). Вирус, близкий штамму ВК, изолирован также из ретикулоцеллюлярной саркомы мозга и мочи пациентов с синдромом Wiskott-Aldrich, сцепленного с полом рецессивного заболевания человека с выраженным подавлением гуморального и клеточного иммунитета и высокой частотой опухолей ретикулоэндотелиальной системы (Takemoto et al., 1975).

Не исключено, что вирусы группы Парова играют определенную роль и в этиологии такого заболевания ЦНС человека, как подострый склерозирующий панэнцефалит (Koprowski, 1971).

#### ГРУППА АДЕНОВИРУСОВ

Это довольно крупные — около 80 нм — резистентные к эфиру вирусы сложного антигенного состава с кубическим типом симметрии. Вирион состоит из 252 белковых капсомеров, ДНК вируса двуспиральна и линейна, молекулярный вес ее около  $20-25 \cdot 10^6$  дальтон. По крайней мере 13 типов (из 31) аденовирусов человека, 6 типов аденовирусов обезьян, 1 тип аденовирусов крупного рогатого скота, 2 типа аденовирусов собак, 2 типа аденовирусов птиц обладают онкогенными свойствами *in vivo* или трансформирующей способностью *in vitro*.

Особенностью онкогенного или трансформирующего действия аденовирусов является то, что это свойство их проявляется только при инфекции непривитых хозяев вируса — крыс, мышей, хомячков. В клетках же природных хозяев *in vivo* или *in vitro* аденовирусная инфекция протекает продуктивно с образованием вирионов в ядре и характерным цитопатогенным эффектом (Green, 1970; Дрейзен, Жданов, 1962). Грин и его сотрудники (Green, 1970) первыми предприняли широкие и разносторонние исследования ДНК аденовирусов человека с целью обнаружить физико-

химические различия между онкогенными и неонкогенными штаммами. Всего был изучен 31 штамм аденовирусов, которые были условно разделены на три группы: 1) высокоонкогенные типы аденовирусов человека — группы А; сюда входят типы 12, 18 и 31; 2) низкоонкогенные типы аденовирусов — группа В; сюда входят типы 3, 7, 11, 14, 16 и 21. Высокоонкогенные штаммы характеризуются способностью вызывать опухоли у 80—100% животных с латентным периодом менее 2 месяцев при введении очищенного вируса новорожденным хомячкам. Для низкоонкогенных штаммов при той же дозе инфицирования характерен и более длительный латентный период и значительно более низкий (около 20%) процент индукции опухолей; 3) группа С — типы 1, 2, 5, 6 не индуцировали опухоли у хомячков, однако *in vitro* они трансформировали крысиные эмбриональные клетки.

Члены каждой группы имели сходный между собой нуклеотидный состав. Опыты по ДНК — ДНК гибридизации молекул вирусных нуклеиновых кислот отдельных типов показали высокую степень гомологии внутри каждой группы. В то же время степень гомологии вирусных ДНК между членами разных групп не превышала 25%. (Так как различные типы аденовирусов человека имеют общие антигены, та часть генома, которая дает общую степень гомологии у разных штаммов, по-видимому, и кодирует синтез этих антигенов.) Не было найдено значительной гомологии и между ДНК разных типов аденовирусов человека и онкогенных аденовирусов обезьян (см. Green, 1970).

Анализ ДНК разных штаммов показал, что у высокоонкогенных штаммов (группа А) содержание ДНК и ее плавучая плотность ниже, чем в группах В и С. Расчет показал, что представители группы А содержат примерно на 2—4 вирусных гена меньше, чем вирусы групп В и С.

Химический состав аденовирусных ДНК подтвердил различия вирусов этих трех групп — содержание Г+Ц для высокоонкогенных штаммов равно 48—49%, 49—52% для слабоонкогенных и 57—59% для аденовирусов группы С. Однако корреляция низкого содержания Г+Ц с высоким уровнем онкогенности не подтвердилась при сравнении онкогенных и неонкогенных аденовирусов обезьян. Там соотношение оказалось обратным (Green, 1970).

Подобно вирусам группы Рарова в процессе продуктивной инфекции клетки аденовирусами синтезируется вирусспецифический невирионный антиген, локализующийся в ядре (этот антиген так же, как и в случае вирусов группы Рарова, носит название Т-антигена). Т-антиген синтезируется и в процессе abortивной инфекции, и синтез его постоянно обнаруживается в опухолевых клетках или клетках, трансформированных *in vitro*. Синтез Т-антигена при продуктивной инфекции предшествует синтезу вирусной ДНК (ранний белок) и не блокируется ингибиторами

синтеза ДНК. Штаммы внутри каждой группы (А, В и С) индуцируют иммунологически сходный Т-антиген. Т-антигены разных групп аденовирусов антигенно различны. Это хорошо согласуется с тем фактом, что вирусспецифическая РНК, синтезируемая в опухолевых клетках (где идет постоянный синтез Т-антигена, но не образуются антигены вириона), различается по последовательности оснований для вирусов разных подгрупп, но внутри каждой подгруппы имеет сходный состав. TSTA — транслантационный вирус специфический антиген также индуцируется аденовирусами на поверхности трансформированных или опухолевых клеток. Однако изучены они недостаточно.

Спектр опухолей, индуцируемых онкогенными аденовирусами у грызунов, оказался очень широким — недифференцированные саркомы, лимфомы, лимфосаркомы и даже фиброаденомы молочных желез.

Типы 9, 10, 13, 15, 17, 19 и 26 аденовирусов человека, не вошедшие в группы А, В и С, тем не менее, как впоследствии выяснилось, оказались способными трансформировать *in vitro* перmissive для аденовирусов хомячковые и крысиные клетки. Трансформированные клетки синтезировали Т-антиген, который оказался общим для всей этой группы аденовирусов (группа D), но отличным от Т-антигенов группы А, В и С. Особенностью клеток, трансформированных аденовирусами группы D, явилось отсутствие в ней (или очень малое количество?) вирусспецифической РНК; эти данные, однако, требуют подтверждения (McAllister et al., 1969).

В общем, по-видимому, все типы аденовирусов могут считаться потенциально онкогенными *in vivo* или *in vitro* для перmissive клеток, правда, в весьма разной степени (Green, 1970).

Как серологические, так и молекулярно-биологические подходы не позволили получить каких-либо данных о роли аденовирусов человека в онкогенезе у их природного хозяина. Большинство попыток трансформировать *in vitro* человеческие клетки также оказались неудачными. Некоторые авторы при инфекции фибробластов человека аденовирусом 12 типа получали в таких культурах фокусы многослойного роста или другие признаки трансформации. Частота таких фокусов была выше на клетках от людей с анемией Фанкони (генетическая болезнь, сопровождающаяся высокой частотой опухолей). Однако ни в одном случае «бессмертных линий» из таких клеток получить не удалось (Todaro, Aaronson, 1968).

#### ВИРУСЫ ГРУППЫ ГЕРПЕСА

В эту группу входят чувствительные к эфиру, крупные — размерами около 110 нм — вирусы, характеризующиеся кубической симметрией капсида, построенного из 162 капсомеров. Вирионы

содержат двуспиральную линейную ДНК с молекулярным весом около  $100 \cdot 10^6$  дальтон. Нуклеокапсид вириона формируется в ядре, а наружная оболочка — из мембранных компонентов ядра или цитоплазмы. Вирусы этой группы являются этиологическими агентами лимфоидных и эпителиальных опухолей: вирус Люке — аденокарциномы почек леопардовых лягушек, герпес-вирус *Sylvilagus* — лимфомы диких белохвостых кроликов, герпес-вирус *Saimiri* и герпес-вирус *Ateles* — лимфом обезьян, вирус болезни Марка — лимфоматоза кур, вирус Эпштейн-Барр — инфекционного монукулеоза человека и, возможно, лимфомы африканских детей (лимфомы Бэркитта) и назофарингеальной карциномы. По-видимому, некоторые формы лейкоза морских свинок и крупного рогатого скота также могут быть вызваны вирусами группы герпеса. Не исключено, что вирусы этой группы играют этиологическую роль и при аденоматозе легких овец и раке шейки матки человека (см. подробно материалы симпозиумов *Herpesviruses and Cancer*, 1972; *Oncogenesis and Herpesviruses*, 1972; *Herpesvirus and Cervical Cancer*, 1973; *Human tumor associated with Herpesviruses*, 1974).

Наиболее изучены четыре представителя этой группы.

#### *Вирус Люке*

Вызывает в природных условиях аденокарциномы почек леопардовых лягушек. Так, примерно, у 10% взрослых лягушек, отловленных в природных водоемах США, обнаруживаются эти опухоли. Содержание таких лягушек при повышенной температуре ( $25^\circ$ ) приводит к 50—100%-ной частоте «спонтанной» индукции таких опухолей. Было показано, что температура является детерминирующим фактором перmissивности или неперmissивности почечных клеток к вирусу. При повышенной температуре возникают метастазирующие опухоли, в которых не удается обнаружить инфекционный вирус; при температуре  $4-9^\circ$  опухоли регрессируют, в почках видны некрозы, обусловленные цитопатогенным действием вируса; в инфицированных клетках выявляются характерные внутриядерные включения; из таких опухолей и тканей удается выделить онкогенный вирус. Способ передачи вируса в природных условиях не изучен (см. Gross, 1970; McKinnell, Ellis, 1972).

#### *Вирус болезни Марка (БМ)*

Вызывает у кур мультифокальную лимфому во внутренних органах, мышцах, периферических нервах и коже. Описаны две формы БМ, одна из которых — спорадическое заболевание, носящая название нейролимфоматоз или птичий паралич, с прогрессирующим хроническим течением и характерной лимфоретикулярной



пролиферацией периферических нервов и изредка внутренних органов, и другая — острая, носящая название острый лейкоз, с очень острым, злокачественным течением, поражающая на некоторых птицефермах до 80% кур. Описаны и доброкачественные формы БМ, напоминающие инфекционный мононуклеоз человека.

Вирус БМ имеет характерную морфологию вирусов группы герпеса. Молекулярный вес ДНК вируса  $10 \cdot 10^7$  дальтон содержание Г+Ц в ней 56%, плавучая плотность — 1,7 г/мл (см. Раупе, 1973). Лимфоидные клетки не содержат инфекционного вируса и вирусного антигена. Однако в определенных лимфоидных клетках — селезенки, тимуса и бурсы Фабриция — больных птиц вирусный антиген синтезируется, и хотя в таких клетках не происходит созревания полного инфекционного вируса, они гибнут. У молодых животных в отсутствие антител к вирусу в этих клетках возможно может происходить и полный цикл созревания вируса БМ, сопровождающийся массовой гибелью инфицированных клеток (острая фаза) (см. Раупе, 1973; Nazerian, 1973).

Многочисленные безуспешные попытки обнаружить и выделить инфекционный вирус из опухоли или из органов больных птиц находились в противоречии с данными о высокой контагиозности этого заболевания. Впоследствии было показано, что только в одной тканевой системе, а именно в клетках эпителия перьевых фолликул кожи инфицированных кур, постоянно происходит созревание полного инфекционного вируса, сопровождающееся гибелью клетки — продуктивная инфекция (Calnek et al., 1970). При этом имеется прямая аналогия с процессом созревания вируса папилломы Шоуна: инфекционный вирус Марека образуется лишь в поверхностных слоях слущивающегося эпителия, и этот вирус и является источником горизонтальной инфекции кур. В клетках куриной и утиной эмбриональной ткани *in vitro* вирус вызывает продуктивную инфекцию, но образуются при этом главным образом «голые» вирионы, тесно связанные с клеткой.

Генетические факторы имеют важное значение в резистентности или чувствительности кур к индукции БМ. Резистентность при скрещиваниях доминирует над чувствительностью. Механизм такой резистентности кур к вирусу БМ отличен от того, который имеет место в случае РНК-содержащих лейкозных вирусов птиц и, по-видимому, реализуется не «на уровне» клеток-мишеней, а «на уровне» иммунной реакции организма и зависит от возраста и пола подопытных птиц. Так, тимэктомия резко повышает чувствительность цыплят резистентных линий к индукции опухолей; в чувствительных линиях тимэктомия практически не оказывает никакого эффекта.

Лимфоидные клетки-мишени трансформирующего действия вируса БМ имеют Т-клеточное происхождение, в то время как лимфолейкоз, индуцированный у кур РНК-содержащими вирусами,

по-видимому, В-клеточного происхождения. Опухолевые клетки, не содержащие вируса или вирусных антигенов, содержат специфический мембранный опухолевый антиген, природа которого еще не установлена.

Вирус БМ широко распространен в популяции кур, с чем и связан высокий процент «сероположительных» птиц. При этом геном вируса БМ может находиться в интегрированной форме в нормальных лимфоидных клетках здоровых животных. Основная форма носительства вируса — латентная бессимптомная инфекция. Иммунологические факторы, в частности, антитела к вирусу, пассивно передаваемые от матери трансвариально, играют существенную роль не только в чувствительности-резистентности птиц к вирусу БМ, но и в патогенезе БМ, определяя характер ее течения и распространенность процесса (см. Klein, 1972; Calnek, Witter, 1972; Biggs, 1973; Payne, 1973; Nazerian, 1973).

В последнее время появилось несколько сообщений о возможном взаимодействии герпесного вируса и онкорнавирусов (см. ниже) при индукции опухолей у цыплят вирусом БМ. Совместная инфекция вирусом БМ и RAV-2 (неонкогенный онкорнавирус) вела к значительному повышению частоты индукции опухолей и смертности цыплят по сравнению с моноинфекцией вирусом БМ. Возможность участия генома онкорнавируса в индукции опухолей вирусом БМ подтверждается и данными молекулярной гибридизации (Peters et al., 1973).

Были получены прямые доказательства роли онкорнавирусов в патогенезе БМ: в отсутствие РНК-содержащих вирусов группы птичьего лейкоза и цыплят при монбинфекции их вирусом БМ развивалось острое, деструктивное летальное заболевание, характеризующееся аплазией костного мозга, анемией и дегенеративными изменениями бурсы и тимуса. Ни в одном случае опухоли не были обнаружены. При совместной инфекции цыплят вирусом БМ и RAV-2 опухоли возникли в 100% случаев, инфекция только одним штаммом RAV-2 ни к какой индукции опухолей не приводила (Frankel et al., 1974).

До получения эффективных вакцин БМ наносила громадный экономический ущерб птицеводческим хозяйствам. Сейчас выделены апатогенные для кур природные штаммы вируса, которые с успехом используются для серийной вакцинации кур. Однако, защищая цыплят от онкогенного действия вируса БМ, вакцинация не подавляет продуктивного размножения патогенного вируса в клетках перьевых фолликулов. При этом, как вирулентный, так и авирулентный вирус сохраняется у птиц на протяжении всей их жизни. Механизм этого феномена, имеющего большой теоретический и практический интерес, пока не ясен (см. Klein, 1974; Мазуренко и др., 1972).

*Герпесные вирусы обезьян  
Saimiri и Ateles*

Мелендец и сотр. (Melendez et al., 1969) из почечной культуры здоровой беличьей обезьяны (*Saimiri sciureus*) выделили вирус герпеса (HVS — Herpes Virus Saimiri), который вызывает в эксперименте злокачественные лимфомы и лимфатические лейкемии у нескольких видов обезьян Нового Света разных возрастов — мартышек, ночных обезьян, паукообразных обезьян, цепкохвостых капуцинов. В ряде случаев у инокулированных животных развивается доброкачественное лимфопролиферативное заболевание, напоминающее инфекционный мононуклеоз человека. Описана индукция лейкоза и у кроликов при введении им HVS.

В опухолевых клетках обезьян *in vivo* ни вируса, ни вирусных антигенов обнаружить не удается. Лимфоидные клетки Т-типа непермиссивная система для HVS — являются мишенями трансформирующего действия вируса *in vivo* и *in vitro*. Клетки не лимфоидного происхождения — фибробласты и эпителиальные клетки обезьян — пермиссивная система для вируса *in vitro*, где он размножается с цитопатогенным эффектом.

Вирус HVS чрезвычайно широко распространен в популяции природного хозяина. Так, антитела к вирусу обнаруживаются у 100% беличьих обезьян старше двух лет; однако у молодых обезьян до 6-месячного возраста антитела, как правило, не обнаруживаются. Вирус может в латентной (геномной?) форме находиться в лимфоидных клетках здоровых обезьян. По-видимому, основным источником вируса, передаваемого только горизонтально, — слюна и, возможно, моча здоровых обезьян *Saimiri*, несущих латентную инфекцию. Не исключено, что *in vivo* эпителиальные клетки носоглотки — пермиссивная система для размножения вируса HVS (см. Deinhardt, 1973; Barahona et al., 1974).

Для своего природного хозяина HVS оказался полностью непатогенен. Причина этого не установлена, хотя не исключено, что факторы иммунитета — клеточные или гуморальные — играют детерминирующую роль в резистентности беличьих обезьян к патогенному действию вируса. «Природная» лейкемия, вызванная HVS, недавно была обнаружена у ночных обезьян.

Антигено-отличный от HVS герпетический вирус (Herpes Virus Ateles — HVA), выделенный от здоровых паукообразных обезьян (*Ateles paniscus*), также оказался онкогенным: он вызывает злокачественные лимфомы (Т-типа клеток) у обезьян Нового Света, но не у своего природного хозяина (Melendez et al., 1972). Так же как HVS вирус HVA *in vitro* трансформируют Т-тип лимфоидных клеток обезьян (Deinhardt, 1973; Barahona et al., 1974).

*Вирус Эпштейн — Барр*

Беркитт (Burkitt) в 1958 г. описал необычную опухоль шеи (лимфому) у детей в Уганде; эндемичность распространения этой опухоли, связанная с климатическими условиями, раннее появление и высокая частота ее у детей дали возможность автору предположить вирусную этиологию опухоли. Позднее было показано, что лимфома Беркитта (ЛБ) — наиболее часто встречающаяся опухоль детей тропической Африки и о. Новая Гвинея. В других районах опухоли типа ЛБ встречаются чрезвычайно редко. В 1963—1964 гг. Эпштейн и др. (см. Epstein, Achong, 1973) получили несколько перевиваемых лимфобластоидных линий из ЛБ и обнаружили в них при электронно-микроскопическом исследовании вирионы, по размерам и структуре характерные для вирусов группы герпеса. Описанный ими вирус, антигенно отличный от известных ранее вирусов группы герпеса, был назван вирусом Эпштейн — Барр (EBV — Epstein Barr Virus) и в настоящее время является одним из самых изученных онкогенных вирусов группы герпеса (см. Klein, 1972; Epstein, Achong, 1973; Henle, Henle, 1973).

EBV содержит ДНК с молекулярным весом  $1 \cdot 10^8$  дальтон и плавучей плотностью 1,719 г/мл; содержание Г+Ц равно 57%. Этиологическая роль EBV в ЛБ основана на следующих данных:

1. Во всех лимфобластоидных линиях ЛБ *in vitro* или в биопсийном материале обнаружены вирусспецифические или вирусиндуцированные антигены EBV.

2. Все больные ЛБ имеют антитела к различным компонентам EBV или к вирусиндуцированным антигенам в титрах, значительно превышающих «средний» показатель таких антител в популяции. Колебания титра антител у больных с ЛБ связаны с характером течения заболевания.

3. Геном EBV регулярно обнаруживается в геноме клеток ЛБ. Последующее изучение эпидемиологических особенностей EBV показало, что вирус чрезвычайно широко распространен в человеческой популяции и антитела к нему обнаруживаются у 70—80% здоровых людей в разных странах и частях света. Инфекционный вирус EBV регулярно удается выделять из смывов носоглотки здоровых людей; не исключено, что эпителий носоглотки окажется той перmissive системой, где происходит продуктивная инфекция клеток EBV.

Вирус передается только горизонтально; основным возраст инфицирования 4—5 лет. Обнаружение антител у повзрослевших, по-видимому, связано с пассивным переносом их от матерей. Антитела к антигенам EBV были обнаружены также и у многих видов обезьян Старого Света (но не Нового), включая и высших приматов.



Если этиологическая роль EBV при ЛБ основана, по понятным причинам главным образом на непрямых доказательствах, то роль EBV как этиологического агента при инфекционном мононуклеозе (ИМ) человека — доброкачественном лимфопролиферативном заболевании — в настоящее время можно считать доказанной. EBV вызывает ИМ только у «серонегативных» лиц; от таких больных выделен инфекционный вирус, а перенесенное заболевание превращает «серонегативного» человека в «сероположительного» (см. Henle, Henle, 1973; Klein, 1973).

Лимфоидные клетки являются непермиссивной системой для EBV. Однако надо сказать, что пермиссивных систем для вируса обнаружить пока не удалось. Инфекционный вирус получают из вируспродуцирующих лимфобластоидных линий ЛБ; число таких клеток в культуре, как правило, невелико, а продуктивная инфекция сопровождается гибелью клетки.

EBV вызывает морфологическую трансформацию лимфоидных клеток человека и обезьян *in vitro*. Эта трансформация приводит к способности таких клеток пассироваться в культуре ткани бесконечно («бессмертные» линии). Таким же свойством обладали лимфоидные клетки, взятые, от «серопозитивных» здоровых людей или людей, больных инфекционным мононуклеозом. Во всех таких клеточных линиях обнаруживались множественные копии генома EBV. Лимфоидные клетки, новорожденных или «серонегативных» взрослых людей имели конечный срок жизни *in vitro*. Клетки, трансформированные EBV *in vitro*, или лимфобластоидные линии ЛБ имеют В-клеточное происхождение.

Все попытки индуцировать опухоли EBV у экспериментальных животных, включая разные виды обезьян, до последнего времени были безуспешными. Однако недавно Шоуп и др. (Shope et al., 1973) и Эпштейн и др. (Epstein et al., 1973) при введении EBV вызвали ретикуло-клеточные саркомы у белохвостых и ночных мартышек. Клетки обезьяньих опухолей синтезировали антигены EBV и содержали множественные геномы вируса (Epstein et al., 1975). Создается впечатление, что все необходимые доказательства того, что EBV является онкогенным вирусом, в настоящее время получены.

Однако не совсем ясно, является ли EBV этиологическим агентом ЛБ. Дело в том, что в материалах от больных ЛБ из США или Европы геном EBV в ДНК опухолевых клеток обнаружен не был (Nopouama et al., 1974). Совершенно не ясно, каков механизм, «детерминирующий» доброкачественное действие EBV при ИМ и злокачественное — при ЛБ: взаимодействия и экспрессии вирусного генома или различия в свойствах разных штаммов (см. Rickinson et al., 1974).

EBV связывают и с этиологией другой опухоли человека — назофарингеальной карциномы. Антитела к EBV у людей с этой

опухолью обнаружены в 100% случаев в титрах, даже превышающих титры антител при ЛБ. В то же время пациенты с гипоплазией орофарингеальными карциномами или неэпителиальными опухолями носоглотки были или серонегативны или имели «стандартный» низкий титр антител к EBV. Серологические данные хорошо согласуются с данными молекулярной биологии: ДНК EBV регулярно обнаруживается в геноме клеток назофарингеальной карциномы (но не других опухолей носоглотки).

Необычайно высокий титр антител к антигенам EBV обнаружен и у больных с саркоматозной формой болезни Ходжкина. Однако метод молекулярной гибридизации не позволил выявить достоверные количества ДНК EBV в геноме клеток этой опухоли. Данные о других «серопозитивных» к EBV заболеваниях людей, например хронической лимфоцитарной лейкемии и саркоме, требуют более детальной проверки (Klein, 1972, 1973).

\* \* \*

Вирусы группы герпеса как возможные этиологические агенты опухолей у разных видов животных, включая и человека, привлекают к себе пристальное внимание вирусологов и онкологов. Сейчас работа с герпесными вирусами ведется очень широким фронтом как в направлении поисков новых герпетических онковирусов, так и при изучении онкогенных свойств «старых» вирусов группы герпеса.

Так, сероэпидемиологические данные и обнаружение вирусных антигенов в опухолевых клетках позволяют предполагать, что HSV-2 (вирус герпеса простого второго типа) может играть роль в этиологии карциномы шейки матки. Косвенно это подтверждается тем, что облученный УФ HSV-2 может *in vitro* вызывать злокачественную трансформацию хомячковых (Duff, Rapp, 1971a, b) и крысиных (Machab, 1974) клеток. Однако прямые данные о роли HSV-2 в этиологии карциномы шейки матки пока отсутствуют. Данные же молекулярной гибридизации с целью обнаружить геном HSV-2 в опухолевых клетках не дали четких результатов. Вирус HSV-2 очень широко распространен в популяции людей, имеет сильное сродство к генитальным органам и передается, по-видимому, половым путем.

Другой тип герпесного вируса HSV-1 также чрезвычайно широко распространен в популяции людей и является этиологическим агентом «лихорадки» кожи и слизистой губ и носоглотки. HSV-1 (вирус герпеса простого первого типа), облученный УФ, также оказался способным вызывать злокачественную трансформацию хомячковых клеток (Duff, Rapp, 1973). Дараи и Мунк (Daraï, Munk, 1973) показали, что при непермиссивных условиях (повышенная температура) интактный HSV-1 может трансформировать *in vitro* и клетки эмбрионального легкого человека.

Насколько эти данные, полученные *in vitro*, соответствуют роли HSV-1 и HSV-2 в канцерогенезе «природных» опухолей человека, судить сейчас не представляется возможным (см. Roizman, 1974).

Получены результаты, показывающие, что и вирусы цитомегалии (подгруппа вирусов герпеса) также могут играть роль этиологических агентов при опухолевых заболеваниях. Это касается в первую очередь данных Г. И. Дейчман и др. (1974), показавших, что вирус цитомегалии зеленых мартышек может вызывать у трех видов обезьян сходное с инфекционным мононуклеозом человека заболевание, а также данных о трансформации *in vitro* клеток человека вирусом цитомегалии, облученным УФ (Albrecht, Rapp, 1973). Для вирусов группы цитомегалии, так же, как и для других вирусов группы герпеса, характерно широкое, практически ubicвитарное распространение и латентное бессимптомное носительство у природного хозяина вируса.

#### ВИРУСЫ ГРУППЫ ОСПЫ

Сюда относятся крупные (около 300 нм) вирусы со сложным типом симметрии. Созревание вирусных частиц происходит в цитоплазме клетки. Вирионы содержат линейную двуспиральную ДНК с молекулярным весом  $160-240 \cdot 10^6$  дальтон. Содержание Г+Ц в ДНК вируса фибромы кроликов  $\sim 40\%$ . Вирусы этой группы вызывают у своих природных хозяев доброкачественные, спонтанно регрессирующие соединительнотканнные опухоли. В эту группу входят вирусы фибромы кроликов, зайцев, белок, вирус Яба, вызывающий доброкачественные гистиоцитомы обезьян, вирус контактиозного моллюска человека и, возможно, вирус генитальной папилломы свиней и папилломы сумчатых (см. Gross, 1970; Tooze, 1973).

Введение вируса фибромы кроликов новорожденным крольчатам или взрослым животным в сочетании с облучением, иммунодепрессантами или химическими канцерогенами вызывает индукцию нерегрессирующих опухолей со злокачественным течением. Инфекция обезьян вирусом Яба с последующей обработкой животных химическими канцерогенами или облучением не изменяла характера роста опухолей.

Не исключено также, что вирусы группы оспы сами могут являться коканцерогенными агентами, активируя онкогенные вирусы. Ныне классическим примером этого являются опыты Н. П. Мазуренко (1962) по индукции лейкоза у мышей вирусом осповакцины. Имеются также сообщения польских авторов о возможности трансформации *in vitro* клеток мышей вирусом осповакцины (Koziorwska et al., 1971). Уместно в этой связи вспомнить работы лаборатории Дюран-Рейнальса (см. Duran-Reynals, 1957)

о значительном повышении частоты индукции опухолей у обработанных канцерогеном мышей при внутрикожной инфекции их вирусом осповакцины. Предварительная иммунизация таких животных вирусом подавляла повышение частоты индукции опухолей.

Вирусам этой группы присущ довольно узкий спектр чувствительных животных. Правда, к онкогенному действию вируса Яба чувствительно несколько видов обезьян; патогенность этого вируса для других лабораторных животных установить не удалось.

Свойства вирусов этой группы и механизм их онкогенного действия изучены мало главным образом из-за отсутствия адекватных моделей *in vitro* (см. Green, 1970; Gross, 1970; Tooze, 1973).

\* \* \*

Из пяти известных сейчас групп ДНК-содержащих вирусов четыре имеют в своем составе онкогенных «представителей». При этом наблюдается тенденция к увеличению в каждой группе числа вирусов, у которых обнаруживают онкогенные свойства *in vivo* или способность трансформировать клетки *in vitro*. Действительно, практически все типы аденовирусов человека способны вызывать опухоли или трансформировать клетки в непермиссивных системах. Значительно «возросло» число онкогенных вирусов группы герпеса; то же относится и к вирусам группы Рарова. Возникает вопрос: а можно ли вообще говорить о существовании каких-то особых вирусов, с онкогенными свойствами, быть может, все вирусы описанных выше четырех групп потенциально онкогенны (или обладают свойством трансформировать клетки *in vitro*) при определенных условиях, например, в непермиссивных системах?

Во всяком случае, история обнаружения и изучения онкогенных вирусов группы герпеса дает основания для такой точки зрения. Ее можно принять или оспаривать, но уже сама постановка такого вопроса, имеющая под собой фактический материал, говорит о том громадном сдвиге в области онковирусологии, который произошел в последние 10—15 лет. Для ДНК-содержащих вирусов эта современная эра связана безусловно с открытием и выделением вируса полиомы и SV40; в последнее время такой «горячей точкой» являются вирусы группы герпеса.

«Природная» история вирусов SV40 и РУ изучена достаточно полно. Большой материал накоплен о свойствах герпетических вирусов различных видов животных, а также о свойствах и характере онкогенного действия аденовирусов. Возможно ли на основании наших знаний об этих группах вирусов построить некую обобщенную «модель» ДНК-содержащего онкогенного вируса и характера его взаимодействия с клеткой и организмом?

Обращает на себя внимание поразительно широкое, практически ubicвитарное распространение онкогенного ДНК-содержащего



вируса в популяции природного хозяина и почти полное отсутствие или чрезвычайно низкая частота «природных» опухолей, вызванных этим вирусом у природного хозяина; при этом характерен высокий сероположительный «фон» всей взрослой популяции природного хозяина.

Весь экспериментальный материал по эпидемиологии ДНК-содержащих онкогенных вирусов дает основание предполагать, что основным, а быть может, и единственным типом передачи онковирусов этих групп является горизонтальная инфекция.

Возможность инфицирования ДНК-содержащим онковирусом имеется уже в самые первые дни после рождения; однако именно в этот наиболее чувствительный к онкогенному действию вируса период новорожденные или сосунки надежно защищены пассивно переданными им материнскими антителами. К тому моменту, когда эти антитела исчезают, чувствительность к вирусу или возможность проявления его онкогенных свойств резко снижена, а инфекция ведет к латентному носительству вируса, которое, по-видимому, приводит к индукции стойкого иммунитета (инфекционный иммунитет?) и выраженной иммунной реакции.

Прямые экспериментальные факты показывают, что иммунологические факторы часто играют детерминирующую роль в чувствительности-резистентности природного хозяина к онкогенному действию ДНК-содержащего онкогенного вируса. Наряду, а быть может, и в связи с этим — основная форма инфекции — длительное бессимптомное, латентное носительство и выделение вируса. Лишь в экзотических условиях, связанных с резким снижением иммунитета (например, при облучении, воздействии иммунодепрессантами), можно ожидать резкого увеличения частоты «природных» опухолей, индуцированных ДНК-содержащими вирусами.

Природа и типы латентности для разных групп ДНК-содержащих вирусов, возможно, различны, а механизмы их изучены еще очень мало. Если для вирусов группы Рарова — РУ и SV40 — основной природный тип носительства, по-видимому, «классическая» бессимптомная инфекция, то герпесные вирусы могут наряду с этим персистировать латентно (не трансформируя или не убивая клетку) и в геномной форме — в форме, при которой геном вируса присутствует в клетке, а вегетативный цикл его не имеет места. Возможно, что и характер, и направленность иммунного ответа, детерминирующего чувствительность-резистентность, будет различен у этих двух типов носительства.

Если на уровне организма иммунные факторы являются, по-видимому, определяющими для проявления онкогенного действия ДНК-содержащего вируса, то на уровне клетки таким детерминирующим фактором является непермиссивность клетки.

Непермиссивность клетки — основное условие проявления онкогенного или трансформирующего действия ДНК-содержащего

вируса. В перmissive системе цитопатогенное действие «защищает» клетку от трансформации.

В принципе мы можем выделить два возможных варианта неперmissiveности. Первый из них обусловлен неперmissiveностью самой клетки; как правило, такими клетками будут клетки природного хозяина, хотя очень часто спектр цитопатогенного действия вируса может значительно выходить за рамки «природной» системы. Однако столь же возможна неперmissiveность клеток, обусловленная определенным типом дифференцировки, — например, лимфоидные клетки, как правило, являются перmissive системой для онкогенных вирусов группы герпеса, в то же время эпителиальные клетки или фибробласты природного хозяина — перmissive система для этого вируса. Второй основной тип неперmissiveности — инфекция даже перmissive клеток дефектным, неполным вирусом, неспособным из-за делеции или мутации своего генома к вегетативному циклу репродукции. По-видимому, для вирусов группы Раова (РУ, SV40 и др.) и аденовирусов трансформация клеток природного хозяина возможна только неполными дефектными вирусными частицами.

Факторы, повышающие неперmissiveность клеток или ведущие к образованию неполных вирусных частиц, могут, таким образом, повышать онкогенный потенциал вируса в природных системах. Эти общие соображения тем не менее не определяют главное — какой ген или гены в геноме вируса непосредственно отвечают за опухолевую трансформацию клетки в природной или не природной системе. Иными словами, можно ли в геноме ДНК-содержащих вирусов выявить онкоген, ген или группу генов, непосредственно «отвечающих» за опухолевое перерождение клетки?

Весь мощный арсенал молекулярной биологии направлен сейчас на решение этого вопроса. Методические возможности таковы, что его решения, по крайней мере на модельных системах *in vitro*, можно ожидать буквально в самое ближайшее время.

Каково бы ни было решение этого вопроса, совершенно очевидно, что по крайней мере три фактора на уровне клетки могут определять онкогенный статус вируса: 1) неперmissiveность (с чем бы она ни была связана — со свойствами клетки или с дефектностью вируса); 2) наличие гена (генов), вызывающего опухолевую трансформацию и 3) способность генома вируса к стойкой интеграции с геномом клетки. Именно интеграция генома вируса в геном клетки и должна являться тем фактором, который наследственно закрепит трансформирующее или онкогенное действие определенных генов онковируса.

Не исключено, что именно способность к интегративному взаимодействию (в сочетании с другими факторами) и является тем патогномичным признаком, который выделяет онкогенные вирусы из царства *Vira*.

---

## Глава третья    ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РНК-СОДЕРЖАЩИХ ОНКОГЕННЫХ ВИРУСОВ

Из девяти известных в настоящее время различных групп РНК-содержащих вирусов представители только одной группы, правда, весьма многочисленной, обладают онкогенными свойствами. В эту группу — она носит название группы онкорнавирусов (онкогенных РНК-содержащих вирусов) или ретравирuсов — входят вирусы сложного полиморфного типа симметрии, высокочувствительные к температуре и эфиру, размером в среднем 100 нм.

Вирионы разных типов онкорнавирусов имеют единый план строения и обладают сходными физико-химическими свойствами. Основной структурный элемент вирусной частицы — нуклеоид, который содержит РНК и один или два низкомолекулярных белка. Нуклеоид окружен наружной двойной мембраной, в состав которой входят липиды, белки и гликопротеиды.

Все типы онкорнавирусов характеризуются четырьмя общими уникальными признаками: 1) они содержат в своем составе одонитчатую высокомолекулярную ( $10-12 \cdot 10^6$  дальтон) РНК с коэффициентом седиментации 60—70S. Эта РНК состоит из 2—4 субъединиц с молекулярным весом около  $3 \cdot 10^6$  дальтон (35—37S) каждая. Экспериментальные данные самого последнего времени не исключают возможности того, что на самом деле геном онкорнавирусов представлен одной молекулой РНК с молекулярным весом  $3,0 \cdot 10^6$  дальтон, а высокий коэффициент седиментации обусловлен, по-видимому, либо специфической конформацией, либо агрегацией, либо какими-то иными факторами; 2) они содержат в составе вириона набор ферментов, необходимых для синтеза ДНК на матрице РНК—РНК- и ДНК-зависимые ДНК-полимеразы; этот ферментный комплекс принято сейчас называть как обратная транскриптаза (reverse transcriptase) или ревертаза — отсюда и другое название этой группы вирусов — ретравирuсы; 3) созревание вирусной частицы происходит в непосредственной связи с мембранными компонентами клетки, а сам процесс созревания и отпочковывания вирусных частиц не приводит клетку к гибели, т. е. продуктивная инфекция в норме не цитопатогенна; 4) плавучая плотность зрелых вирионов онкорнавирусов в градиенте плотности сахарозы составляет, как правило,

1,16 г/мл, что обусловлено высоким содержанием липидов в наружной мембране вириона. Все эти признаки, присущие разным типам онкорнавирусов, характерны для всей этой группы и отсутствуют у многочисленных РНК-содержащих «обычных» инфекционных вирусов (см. Temin, 1971).

В зависимости от структуры и локализации нуклеоида, структуры вирионов и их морфогенеза все типы онкорнавирусов делят на три основные группы — С, В и А (см. Bernhard, 1960; Dalton, 1972).

Онкорнавирусы С-типа характеризуются расположенным в центре электронно-оптически плотным нуклеоидом размером около 80 нм; плавучая плотность нуклеоида в зависимости от способа выделения и вида онкорнавируса колеблется от 1,22 до 1,27 г/мл.

Характерный признак морфогенеза С-типа онкорнавирусов — формирование нуклеоида и самого вириона на наружной мембране клетки; процесс созревания вирусной частицы может происходить и после отделения ее от клетки. Вирионы С-типа различных видов животных могут значительно отличаться один от другого размерами и структурой нуклеоида (Dalton, 1972).

Онкорнавирусы С-типа — возбудители многочисленных лейкозов и сарком у рептилий, птиц, мышей, крыс, кошек, крупного рогатого скота, обезьян. Не исключено, что вирусы этого типа имеют этиологическое значение при лейкозах морских свинок, овец, собак, хомячков, свиней, лейкозах и саркомах человека (см. Gross, 1970; Бергольц, 1973; Tooze, 1973). Тесное взаимодействие вирусов сарком с вирусами, вызывающими различные формы лейкемии, общность и сходство морфологических и физико-химических свойств обеих групп вирусов позволило обозначить их как вирусы лейкозно-саркоматозного комплекса.

Онкорнавирусы В-типа характеризуются асимметрично расположенным электронно-оптически плотным нуклеоидом размером около 50 нм; нуклеоид имеет хорошо различаемую одинарную мембрану. Вирионы онкорнавирусов В-типа отличаются высоким полиморфизмом, на наружной мембране вирионы имеют четко выраженные, характерные отростки. Основное отличие морфогенеза вирионов В-типа от онкорнавирусов С-типа — формирование нуклеоида непосредственно в цитоплазме клетки (Bernhard, 1960; Dalton, 1972; Sarkar, Moore, 1972).

Онкорнавирусы В-типа — возбудители опухолей молочных желез мышей и, возможно, обезьян *M. rhesus*. Вирус обезьян имеет четкие морфологические, антигенные и биологические отличия от частиц В-типа мышей. Сходные вирусные частицы были обнаружены в молоке женщин как здоровых, так и с опухолями молочных желез, в перевиваемых клетках нормальных и опухолевых тканей человека (см. Gross, 1970; Tooze, 1973; Moore, 1974; Быковский и др., 1974).



Характерная особенность вирионов А-типа — присутствие нуклеоида в форме поллой сферы (на срезах это проявляется в форме «бублика»). Онкорнавирусы А-типа делят на две группы: одна из них, так называемые внутрицитоплазматические частицы А-типа, по всей вероятности, являются предшественниками частиц В-типа и, менее вероятно, некоторых форм С-типа; этот тип частиц, как правило, обнаруживают в ассоциациях с С- и В-типом онкорнавирусов. Другая группа — внутрицистеральные частицы, обнаруживаемые в цистернах эндоплазматического ретикула и митохондриях клеток — нормальных и опухолевых, по-видимому, представляет собой тип *suī generis* (см. Dalton, 1972; Миллер и др., 1974). Нет достаточно достоверных данных, которые позволили бы говорить сегодня об этиологическом значении частиц А-типа в канцерогенезе.

Кроме описанных трех морфологических типов (А, В и С) РНК-содержащих вирусов, РНК-зависимая ДНК-полимераза была обнаружена у двух групп инфекционных вирусов, вызывающих цитопатогенное действие в зараженных перmissive клетках. Эти группы вирусов — «пеющие» вирусы млекопитающих и «медленные» вирусы овец — морфологически отличны от онкорнавирусов, а также различаются между собой. «Пеющие» вирусы выделяли из различных опухолей кошек, коров и человека, при культивировании почек нормальных обезьян, но до настоящего времени эти вирусы не удалось связать с какими-либо патологическими поражениями их природных хозяев.

Указанные вирусы по своим размерам (около 70 нм) и размерам нуклеоида (около 40 нм) несколько меньше, чем онкорнавирусы. Нуклеоид в форме поллой сферы формируется в любом участке цитоплазмы инфицированной клетки, а оболочка вириона — на любой мембране инфицированной клетки (см. Parks, Todor, 1972).

«Медленные» вирусы овец представляют собой изолированную группу РНК-содержащих вирусов, морфологически идентичных и серологически родственных — вирус висна, мэди и вирусы прогрессирующей пневмонии овец. Эти вирусы вызывают медленно прогрессирующие демиелинизирующие заболевания ЦНС и лимфо-пролиферативные поражения легких овец; их связывают также с этиологией аденоматоза легких овец (Malmquist et al., 1972). В перmissive клетках культуры ткани природного хозяина они вызывают цитопатогенный эффект, однако при заражении эмбриональных клеток мышей (неpermissive система) *in vitro* вирусы висна и мэди вызывают трансформацию клеток (Takemoto, Stone, 1971). Популяция вирионов этой группы вирусов состоит из двух типов частиц — одни, по-видимому, неинфекционные, размером 100—140 нм, напоминают А-тип онкорнавирусов и формируются на поверхности клетки, другой тип частиц по

структуре и морфогенезу сходен с В-типом онкорнавирусов, но значительно меньше их по размерам (Coward et al., 1970).

Помимо наличия в вирионах обратной транскриптазы, обе группы вирусов — «песящие» вирусы и «медленные» вирусы овец — имеют и другие черты сходства с «классическими» онкорнавирусами: плавучая плотность их вирионов в градиенте плотности сахарозы 1,16 г/мл, они содержат 60—70S РНК, состоящую из субъединиц, и общий с онкорнавирусами характер морфогенеза вирионов. Молекулярный вес РНК вируса виспа несколько меньше, чем у онкорнавирусов —  $7-10 \cdot 10^6$  дальтон, и она отличается от РНК вируса Рауса по своей вторичной структуре в солевых растворах. Метод молекулярной гибридизации показал сходство в последовательности нуклеотидов РНК у вирусов виспа и мэди и отсутствие гомологичности с РНК онкорнавирусов мышей В- и С-типа. В то же время «медленные» вирусы овец интерферируют в культуре ткани с вирусами лейкозов и сарком мышей (Harter et al., 1973; Naase et al., 1974a).

В заключение этого списка онкорнавирусов и сходных с ними агентов нужно добавить, по-видимому, и R-тип вируса хомячков. У золотистых хомячков в опухолевых клетках самой разной этиологии или в клетках хомячков, трансформированных *in vitro* различными агентами (но только в хомячковых!), обнаружены в цитоплазме, в цистернах эндоплазматического ретикулума своеобразные вирусные частицы, названные вирионами R-типа [ранее их обозначали как вирионы H-типа] (Bernhard, Tournier, 1964). Частицы R-типа, по-видимому, широко распространены в популяции золотистых хомячков, содержат 60—70S РНК с молекулярным весом  $10 \cdot 10^6$  дальтон. Размер вирионов около 100 нм, вирионы содержат нуклеоид размером около 45 нм. По морфологии вирионы R-типа близки к «песящим» вирусам; отличительный морфологический признак их — наличие электронно-оптически плотных тяжей, идущих по радиусам от поверхности нуклеоида к наружной мембране. Плавучая плотность вирионов 1,12—1,14 г/мл. Обратная транскриптаза у R-типа частиц не обнаружена (Albu, Holmes, 1973). Однако Биркмайер и др. (Birkmayer et al., 1973) описали более «плотные» частицы R-типа (1,21 г/мл), содержащие обратную транскриптазу. Частицы R-типа связывают сейчас с этиологией некоторых опухолей золотистых хомячков (Mayo et al., 1973).

#### БЕЛКИ ОНКОРНАВИРУСОВ

Основное значение в поддержании структуры вирионов и в проявлении их биологической активности имеют РНК и белок вирусных частиц. Свойствам РНК онкорнавирусов посвящен специальный раздел в главе 7. Изучение же различных аспектов биоло-

гии онкорнавирусов оказалось связанным с анализом или определением их антигенов. Поэтому, прежде чем перейти к общей биологической характеристике онкорнавирусов, мы хотели бы изложить современные данные об их белковой структуре и антигенном строении.

Принцип анализа индивидуальных вирусных белков состоит в предварительной деструкции вирусных частиц с последующим разделением белков различными методами. Наиболее широкое распространение получил метод разрушения вирионов додецилсульфатом натрия в присутствии  $\beta$ -меркаптоэтанола. Получаемые в этом случае полипептиды разделяют затем методом электрофореза в полиакриламидном геле. Недостаток этого метода — значительная потеря антигенной активности анализируемых белков под действием денатурирующего агента (додецилсульфата Na).

Несколько иной метод анализа вирусных белков был предложен Новинским и др. (Fleissner, 1971; Nowinski et al., 1972b). Метод основан на сольubilизации вируса в 6 М гуанидин — HCl с последующим разделением белков на биогеле в присутствии гуанидин — HCl. После диализа и удаления гуанидин — HCl белки сохраняют антигенную активность. Однако можно предполагать, что использование в этом случае денатурирующего агента (гуанидин — HCl) также может приводить к тому, что в процессе ренатурации белка могут наблюдаться «ошибки» при образовании третичной структуры и, как следствие этого, изменение антигенности.

В последнее время Стренд и Огаст (Strand, August, 1973, 1974) применили метод выделения индивидуальных вирусных белков без применения денатурирующих агентов, основанный на деструкции вирионов многократным замораживанием-оттаиванием с последующим разделением белков ионообменной хроматографией. С помощью этого метода удается добиться высокой степени очистки вирусных белков с полным сохранением их антигенной активности.

Полученные этими методами данные позволяют составить следующую картину белкового строения вирионов онкорнавирусов.

#### *Вирионы С-типа*

В вирионах С-типа птиц выявлено семь основных белков, два из которых являются гликопротеидами. По последней номенклатуре гликопротеиды (August et al., 1974) обозначаются символом gp (glicoprotein) с указанием молекулярного веса (уменьшенного в 1000 раз). В вирусе птиц основной гликопротеид имеет молекулярный вес 85 000 дальтон, т. е. gp-85. Для простых белков упо-

требуется символ р (protein) с указанием молекулярного веса (уменьшенного в 1000 раз). Таких белков в онкорнавирусах птиц С-типа — пять: р-10, р-12, р-15, р-19 и р-27. Четыре белка — р-27, р-19, р-15 и р-12 (Duesberg et al., 1968; Hung et al., 1971; Nowinski et al., 1973) — характеризуются групповой (присущей всем вирусам группы лейкозов-сарком птиц) антигенностью [gs-(group-specific) антигены]. Основным антигенным компонентом gs-комплекса — р-27 (Allen, 1968; Bolognesi, Bauer 1970; Bolognesi et al., 1973; August et al., 1974).

Гликопротеиды вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса птиц характеризуются типовой антигенной специфичностью (August et al., 1974).

В последнее время показано, что gr-85 наряду с типовыми антигенными детерминантами содержит и групповые, но в значительно меньшем количестве, а р-19 — типовые детерминанты. Однако антигенность типовых и групповых детерминант у разных белков различна.

У вирусов С-типа млекопитающих, как и в случае вирусов птиц, обнаружено два гликопротеида, основной из них gr-69/71 (Witte et al., 1973; Kennel et al., 1973; August 1974). С другой стороны, у вирусов млекопитающих по сравнению с вирусами птиц на один негликозилированный белок меньше — присутствуют белки р-10, р-12, р-15 и р-30 и отсутствует белок р-19 (Duesberg, Robinson, 1966; McDugald et al., 1970; Moroni, 1972; Graves, Vélizer, 1974).

Основным «внутренним» белком вирионов является белок р-30, он составляет 30—50% от всей массы вирусного белка и обладает как групповыми — только для группы вирусов С-типа данного вида хозяина, так и межгрупповыми антигенными детерминантами (соответственно обозначаемыми как gs-1 и gs-3), общими для онкорнавирусов С-типа разных видов млекопитающих (Schäfer et al., 1969, 1971, 1972a, b; Geering et al., 1970; Gregoriades, Old, 1969; Parks, Scolnick, 1972b; Davis et al., 1973).

Этот белок обнаружен у вирусов С-типа мышей, крыс, кошек, и приматов (Oroszlan et al., 1970, 1971a, b; 1972a, b, c). Размеры его, как правило, колеблются в пределах 27 000—30 000 дальтон. Изучение N-концевых аминокислот белка р-30 вирионов С-типа разных видов млекопитающих показало, что эти белки по данному критерию весьма сходны, что дает основание думать, что р-30 разных видов онкорнавирусов кодируется сходными генами (Oroszlan et al., 1973).

Радиоиммунологическим тестом для вирусов мышей было показано, что белок р-10 обладает только видовой группоспецифической активностью, белок р-15 — типоспецифической активностью, белок р-12 имеет как типовую, так и групповую антигенные активности. Белки р-30 и gr-69/71 обладают всеми тремя указан-



ными видами антигенной активности (Strand, August, 1974; Gronick et al., 1974). Соотношение разных типов антигенной активности у каждого белка разное.

Что касается локализации отдельных вирусных белков, то у вирусов С-типа мышей белок р-12 тесно ассоциирован с высокомолекулярной РНК, образуя ядро вируса. Белок р-30, по-видимому, участвует в образовании оболочки ядра, а белки р-15 и р-19 — в формировании внутренней оболочки вириона. Локализация белка р-10 остается неизвестной (Lange et al., 1973; Green et al., 1973; Stromberg et al., 1974; Nowinski et al., 1973).

Гликопротеиды локализуются на поверхности вириона (Duesberg et al., 1970; Robinson, Hung, 1970; Scheele, Hanafusa, 1971; Witte et al., 1973; Rifkin, Compans, 1971; Katz et al., 1973; Kennell et al., 1973), и этим, вероятно, объясняется то, что антисыворотки к gr-69/71 вирусов С-типа мышей обладают сильным нейтрализующим действием (Steeves et al., 1974).

По белковому составу вирусы С-типа млекопитающих не однородная группа. Исключение составляют вирусы приматов, где при наличии двух высокомолекулярных гликозилированных белков (gr-100 и gr-70) имеется лишь три «обычных» белка — р-29, р-12 и р-10 (Roy-Burman et al., 1974).

Среди белков вириона особое место принадлежит ферменту обратной транскриптазе. Свойствам этого фермента посвящен отдельный раздел в главе VII. Здесь мы укажем только, что белок этот относится к числу белков вириона и что антитела к очищенному ферменту подавляли его энзиматическую активность. Используя этот подход, удалось показать в составе данного фермента как межвидовые, так и групповые детерминанты.

#### *Белки вирионов В-типа онкорнавирусов*

В составе вирионов В-типа онкорнавируса мышей обнаружено пять основных белков (gr-52, gr-36, р-28, р-14 и р-10) и по крайней мере семь минорных компонентов с молекулярными весами от 17 000 до 70 000, два из которых гликозилированы. (Nowinski et al., 1971; Dickson, Skehel, 1974; Teramoto et al., 1974). Основной компонент группового антигена вириона — gr-52 (около 25% всего белка). По-видимому, этот белок локализован на поверхности вирусной частицы. В состав группового антигена вириона входит еще один белок — р-28; локализация его неизвестна. Не обнаружено общих антигенов у белков gr-52 и р-28 MTV (Teramoto et al., 1974). Белки вирионов В-типа мышей не имеют общих групповых или межгрупповых антигенов с антигенами С-типа частиц онкорнавирусов млекопитающих (Parks et al., 1974b).

Белковый состав вируса Мэзон — Пфайцера (М-PMV) еще только изучается, в составе вирионов обнаружено два «внутрен-

них» белка — р-26 и р-15, обладающих групповой специфичностью (Tronick et al., 1974).

Не обнаружено какого-либо антигенного сходства между М-PMV, с одной стороны, и антигенами В- и С-типов онкорнавирусов млекопитающих — с другой (Parks et al., 1974b; Irlin et al., 1974).

#### БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОНКОРНАВИРУСОВ

Мы ставим целью дать лишь конспективное описание биологических свойств различных групп онкорнавирусов, необходимое для понимания общих вопросов механизма вирусного канцерогенеза. Подробное описание биологии патогенных онкорнавирусов читатель найдет в монографии Л. Гросса «Онкогенные вирусы», в которой содержится история вопроса, а также перечислены все основные публикации по этой теме (Gross, 1970).

Практически в каждом из томов широко известных международных изданий — «Advances in Cancer Research», «Progress in Experimental Tumor Research», «Advances in Virus Research» имеются обзоры, относящиеся к отдельным вирусам этой группы, к частным и общим проблемам, так или иначе связанным со свойствами разных групп онкорнавирусов и механизмом действия их *in vivo* или *in vitro*. Многие вопросы биологии РНК-содержащих вирусов освещены в монографиях Н. П. Мазуренко (1962), Л. А. Зильбера, Г. И. Абелева (1962), Л. А. Зильбера (1968), А. И. Агеевко (1969, 1974), В. М. Бергольца (1973).

#### ОНКОРНАВИРУСЫ С-ТИПА

##### *Вирусы лейкозно-саркоматозного комплекса кур*

Эти вирусы являются возбудителями разных типов сарком и разных форм лейкоза — миелобластоза, эритробластоза и лимфолейкоза (см. Vogt, 1965).

Вирусы этой группы имеют общий (идентичный) групповой антиген (антигены) основных белков нуклеоида и антигенно-идентичную обратную транскриптазу. Крайне высока и степень гомологии последовательностей оснований их нуклеиновых кислот между отдельными представителями этой группы (30—75%).

*Вирусы сарком кур.* Большинство известных штаммов вирусов сарком кур являются дериватами исходного штамма вируса саркомы (RSV — Rous Sarcoma Virus), выделенного Раусом

в 1911 г. (Rous, 1911) из спонтанной веретенчатой саркомы кур плимутрок. Пассирование вируса Рауса в разных лабораториях на разных породах и линиях кур, изменение способов и сроков пассирования привели к резкой дивергенции свойств разных сублиний вируса и к появлению генетически стабильных штаммов RSV. Наиболее известные из них — штамм Брайен (В), штамм Шмидт-Руппин (Ш-Р), штамм Харрис, штамм Карр, штамм Mill Hill, штамм Карр-Зильбер (К-З), как правило, название штамму дается по фамилии автора, изучившего или выделившего его. Кроме этих штаммов, описаны оригинальные изоляты вирусов, близких по своим свойствам RSV; наиболее известные — вирус Фужинами, выделенный из спонтанной миксосаркомы кур; вирус, выделенный Энгельбретом — Хольмом; дериват этого вируса — штамм Прага (см. Gross, 1970; Vogt, 1965); штаммы, выделенные А. М. Дядьковой (1966).

Различные штаммы RSV вызывают у чувствительных линий кур характерные саркомы; основная природная клетка-мишень трансформирующего действия вируса *in vivo* и *in vitro* — фибробласт. Способ передачи вируса не выяснен. В эксперименте, при очень высоких дозах заражения, вирус может передаваться при прямом контакте зараженных птиц с интактными.

Высокие дозы вируса RSV при введении молодым цыплятам могут вызывать не только опухоли, но и деструктивный процесс — геморрагическую болезнь, связанную с деструкцией эндотелия сосудов вирусом. Впервые геморрагическая болезнь была описана Дюран-Рейналсом, который детально изучил этот феномен и первый отметил не неопластический, деструктивный характер действия онкогенного вируса на чувствительную клетку (Duran-Reynals, 1958).

Патогенность вируса Рауса не ограничена видом хозяина. Другие виды птиц — утки, фазаны, индюшки, голуби и японские перепелки — оказались чувствительными к онкогенному действию RSV (см. Gross, 1970, Tooze, 1973).

Выдающимся событием в онковирусологии было открытие в 1957 г. Л. А. Зильбером, И. Н. Крюковой и Г. Я. Свет-Молдавским, и А. С. Скориковой патогенности вируса Рауса (штамм Карр — Зильбер) для млекопитающих. Эти данные были подтверждены и расширены в других лабораториях. Многие штаммы RSV оказались способными вызывать саркоматозные опухоли у змей, черепах, крыс, хомячков, мышей, морских свинок, собак, обезьян (см. Zilber, 1965). При этом было показано, что у некоторых видов млекопитающих, главным образом у крыс, RSV может вызывать и своеобразное деструктивно-пролиферативное поражение лимфоузлов — кистозно-геморрагическую болезнь (Zilber, 1962, 1965). Открытие патогенности RSV для животных не только другого вида, но и другого класса, сделанное в пору об-

щей уверенности в высокой видовой специфичности действия онкогенных вирусов, показало, как широк и многообразен может быть спектр патогенного действия онкогенного вируса. Доказательство онкогенного действия вируса полиомы для нескольких видов млекопитающих, полученное несколько лет спустя, уже было воспринято достаточно спокойно. Патогенность разных штаммов RSV для млекопитающих варьировала; описаны и непатогенные штаммы RSV (Zilber, 1965).

Одной из самых характерных особенностей опухолей, индуцированных RSV у млекопитающих, была их нефильтруемость, т. е. отсутствие инфекционного вируса, вызвавшего опухолевую трансформацию, в опухолевой ткани. Если в опухолях кур отсутствие вируса было скорее исключением, связанным с длительным ростом опухоли, возрастом животных или низкой дозой инфицирования, то в опухолях млекопитающих это стало правилом. Таким образом, в прямом опыте подтвердилось представление Л. А. Зильбера о необычном типе взаимодействия клетки с онкогенным вирусом при опухолевой трансформации (см. Зильбер, 1968).

«Раусные» опухоли млекопитающих представляют собой очень удобную модель для изучения различных вопросов вирусного канцерогенеза, что и было доказано, в частности, открытием на этой модели индукции полного онкогенного вируса в «безвирусных» опухолях (см. главу 5).

Оригинальный штамм вируса саркомы Рауса В-77 был выделен из спонтанной фибросаркомы печени кур породы Леггорн чехословацкими исследователями (см. Thurzo et al., 1963). Штамм оказался патогенным для голубей, индюков, фазанов, уток и для млекопитающих — крыс, хомячков. В отличие от всех описанных штаммов В-77 синтезировался и выделялся в инфекционной для цыплят форме из опухолевых клеток крыс. Инфекционный RSV из клеток крыс отличался по антигенным свойствам оболочки вирионов от исходного штамма В-77 (Altaner, Svec, 1966).

Применив новый способ селекции вариантов RSV — предварительное культивирование вируса в клетках мышей *in vitro* — и последующее введение таких инфицированных клеток сингенным мышам, И. Н. Крюкова и И. Б. Обух получили высокопатогенные штаммы RSV, которые оказались онкогенными для взрослых мышей, хомячков, крыс и обезьян (Крюкова и др., 1968). Необычная патогенность этого вируса для взрослых гетерологичных животных и другие особенности «поведения» позволяют выделить этот вариант(ы) вируса RSV (Karr — Зильбер) в особый штамм.

Вирус Рауса был первым онкогенным вирусом, на модели которого удалось получить опухолевую трансформацию клеток *in vitro*. Этот феномен, доведенный Теминым и Рубиним (Temin, Rubin, 1958) до уровня рутинного метода титрования вируса,



имел важное значение для изучения механизма взаимодействия онкорнавирусов с клетками. Впоследствии была показана возможность злокачественной трансформации *in vitro* RSV клеток млекопитающих, включая и человека (Зильбер, Шевлягин, 1964; Zilber, 1965). Как опухоли, так и клетки млекопитающих, трансформированные *in vitro*, не содержат полного инфекционного вируса RSV.

*Вирусы лейкозов кур.* Эти вирусы вызывают различные формы лейкоза птиц (ALV — Avian Leukemia Viruses).

Миелоидные неоплазии кур делятся на два различных типа — миелобластоз, характеризующийся громадным числом лейкозных миелобластов в кровяном русле (до  $10^{10}$  в 1 мл), и миелоцитоматоз — в основном алейкемическая форма с очаговой пролиферацией миелоцитов. Вирус миелобластоза (AMV — Avian Myeloblastosis Virus), лабораторный штамм которого носит название ВАI-A, помимо характерного миелобластоза, вызывает у цыплят саркомы, остеопетроз, лимфоматоз и нефробластомы (все эти типы опухолей — из клеток, производных мезодермы). В отличие от всех других типов ALV, штамм ВАI-A вызывает еще карциномы, саркомы, хондромы и остеонидные поражения почек. До  $10^{13}$  вирусных частиц на 1 мл плазмы синтезируются лейкозными миелобластами и обнаруживаются в крови больных цыплят. AMV размножается в разных типах клеток кур, но эффективно трансформирует *in vitro* только предшественники гематопоэтических клеток.

Из вирусов, вызывающих миелоцитоматоз, наиболее изучен штамм МС-29, выделенный болгарскими вирусологами (см. Младенов, 1974). Этот вирус имеет широкий спектр опухолевой трансформации клеток цыплят — остеохондросаркомы, остеопетроз, эндотелиомы, мезотелиомы, миелобластоз, лимфоматоз, аденокарциномы почек (производные мезодермы), аденомы и карциномы печени (производные эндодермы). *In vitro* МС-29 вызывает очень быструю (около 24 час.) и практически 100%-ную трансформацию клеток эмбриональной ткани цыплят.

По-видимому, и для ВАI-A и для МС-29 клетка-мишень трансформирующего действия вируса одна и та же — экстрасинусоидальный гемоцитобласт. Однако инфекция клетки этими вирусами ведет к разному типу конечной дифференцировки (хотя в обоих случаях и не полной) (Gross, 1970; Beard et al., 1973; Младенов, 1974). Вирус эритробластоза, помимо эритробластоза, вызывает у чувствительных цыплят лимфоматоз, саркомы, остеопетроз, изредка аденокарциномы почек. *In vivo* клетка-мишень трансформирующего действия вируса эритробластоза — интрасинусоидальный гемоцитобласт. При развитой форме заболевания инфицированные клетки не дифференцируются дальше стадии эритробласта. Штамм

И вызывает *in vitro* трансформацию эмбриональных фибробластов цыплят.

Чувствительность цыплят к онкогенному действию вирусов миелобластога и эритробластога зависит от генотипа линии и возраста. При этом к вирусу миелобластога наиболее чувствительны 3-дневные цыплята; 21-дневные цыплята в 40 раз более резистентны, чем 3-дневные. Для вируса же эритробластога зависимость чувствительности кур к онкогенному действию была обратно пропорциональна возрасту (см. Gross, 1970; Beard et al., 1973; Младенов, 1974).

И вирусы типа AMV, и вирусы типа эритробластога представляют собой смешанные гетерогенные популяции, состоящие из трансформирующего *in vitro* вируса, вызывающего основное заболевание, — соответственно миелобластоз или эритробластоз, и нетрансформирующих, но тесно ассоциированных с ними вирусов, по морфологии и антигенным свойствам не отличимых от трансформирующего агента. Такая гетерогенность вирусной популяции была обнаружена и у вируса саркомы Рауса. Эти вирусы получили название RAV и MAV (Rous или Myeloblastosis Associated Viruses) (см. Tooze, 1973). RAV и MAV также оказались гетерогенной популяцией, содержащей как патогенные, так и непатогенные формы. Патогенные формы являются этиологическими агентами висцерального лимфоматоза, а также, по-видимому, нефробластом и остеопетроза (см. Младенов, 1974).

Способность вирусов миелобластога и эритробластога вызывать столь широкий спектр опухолевых поражений разных органов у чувствительных цыплят может быть обусловлена или плюропотентностью лейкозного вируса или гетерогенностью вирусной популяции, состоящей из частиц разной тропности. Мы писали выше об обнаружении в «стоках» AMV нетрансформирующего вируса, вызывающего лимфолейкоз, остеопетроз и нефробластомы. Ни в одном случае у инфицированных таким вирусом цыплят не обнаруживали миелобластоз (Smith, Moscovici, 1969). Введение высококлонированного вируса AMV также вызывало множественные опухоли. Однако введение ДНК, выделенной из лейкоэмических миелобластов, эмбрионам или однодневным цыплятам вызывало у них только нефробластомы (примерно у 50% инфицированных). Клетки таких опухолей продуцировали вирус той же групповой специфичности, что и исходный AMV, однако этот вирус вызывал у цыплят только нефробластомы. Так же, как и другие типы лейкозных вирусов, вирус нефробластом птиц передавался от птицы к птице горизонтально при контакте. Миелобластоз, остеопетроз или лимфолейкоз у цыплят, инфицированных этим вирусом, не были обнаружены (Ogura et al., 1974). Эти данные позволяют предполагать существование унипотентного вируса, специфического для каждого типа лейкоза.

Если миелобластоз и эритробластоз — редкие заболевания кур и описанные штаммы их возбудителей являются скорее всего результатом лабораторных манипуляций, чем циркулирующими в природе агентами, то висцеральный лимфоматоз до недавнего времени занимал одно из центральных мест в патологии кур промышленного птицеводства. Так, в 1949—1952 гг. в среднем около 50 млн. цыплят ежегодно погибало от висцерального лимфоматоза только в США. Болезнь характеризуется первичной локализацией опухолевых лимфоматозных клеток в бурсе Фабриция и последующей их миграцией и инфильтрацией паренхиматозных органов, главным образом печени, селезенки и яичников. Вирус (ы) висцерального лимфоматоза были очень широко распространены в популяциях кур птицеводческих хозяйств разных стран. Основная форма носительства вируса — бессимптомная инфекция. Инфицированные куры могут передавать вирус горизонтально; источник вируса — кал, смывы клюва и носоглотки. Как правило, при горизонтальном пути передачи инфицированные птицы заболевают редко, хотя они сами могут стать источником инфекции. Более частый исход такого пути инфицирования — стойкий иммунитет к вирусу. Однако вирус висцерального лимфоматоза может передаваться и вертикально — от матерей потомству. Инфицирование яйца происходит в яйцеводном пути инфицированных матерей, и у инфицированного эмбриона отмечается выраженная вирусемия. Вылупившиеся цыплята толерантны к вирусу и являются одним из основных источников горизонтальной инфекции; в поздние периоды жизни у большого количества таких цыплят развивается лимфолейкоз (см. Gross, 1970; Beard et al., 1973; Tooze, 1973).

Имеется четкая зависимость чувствительности кур разных линий к вирусу лимфоматоза от генотипа и возраста. Наиболее чувствительны к онкогенному действию вируса 1—2-дневные цыплята (95%); 4-месячные цыплята примерно в 3—4 раза более резистентны.

Бурса Фабриция является «ключевым» органом, обуславливающим развитие висцерального лимфолейкоза: удаление бursы в течение первых трех месяцев жизни практически полностью подавляет развитие заболевания у неонатально инфицированных птиц. Бурсэктомия в возрасте пяти месяцев еще значительно снижает частоту заболевания. Тимэктомия значительного влияния на развитие лимфолейкоза кур не оказывала (Peterson et al., 1964, 1966). Частота остеопетроза, вызванного вирусом лимфолейкоза, резко возрастала у бурсэктомированных цыплят. По-видимому, влияние бursы Фабриция на развитие лимфолейкоза двояко — она может содержать клетки-мишени трансформирующего действия вируса и не исключено наличие в ней гормона, влияющего на рост лимфоидных клеток.

Для вируса лимфоматоза не удалось получить адекватной модели *in vitro*. В культуре эмбриональной ткани вирусы этого типа хорошо размножаются в разных типах клеток кур, но не вызывают их трансформации. Не исключено, что это связано с невозможностью в настоящее время сохранять *in vitro* определенный статус дифференцировки лимфоидных клеток-мишеней, чувствительных к трансформирующему действию вируса.

Лейкоз, вызванный разными типами ALV, был описан не только у лабораторных чистопородных и высокоинбредных линий кур. Он также встречался и на коммерческих, производственных птицефабриках Японии, США, Англии, Советского Союза и т. д. (см. Calnek, 1968; Кравченко и др., 1967).

*Вирусы группы ретикулоэндотелиоза птиц.* У птиц описана группа онкогенных вирусов С-типа, отличная от вирусов лейкозо-саркоматозного комплекса ALV — группа ретикулоэндотелиоза. В настоящее время известны четыре представителя этой группы: вирус ретикулоэндотелиоза птиц, вирус некроза селезенки, вирус инфекционной анемии уток и синцитийобразующий вирус цыплят. Вирус ретикулоэндотелиоза кур вызывает характерный ретикулоэндотелиоз у цыплят, перепелок, утят, гусят, индюшек, фазанов и др. Вирус инфекционной анемии и некроза селезенки тесно ассоциирован с *Plasmodium lophurae*.

Все вирусы этой группы имеют сходную структуру и общие антигены, однако степень патогенности их сильно меняется, хотя и синцитийобразующий вирус и вирус анемии уток могут вызывать у цыплят ретикулоэндотелиоз, правда, с очень низкой частотой. При инфекции утят вирусом ретикулоэндотелиоза описаны некрозы и геморрагии в селезенке. Антитела к вирусам этой группы, но не к вирусу ретикулоэндотелиоза, были обнаружены у индюшек, кур и диких уток и гусей. Вирусы передаются горизонтально; в культуре ткани эмбриональных фибробластов дают цитопатогенный эффект. (см. Halpern et al., 1973). По-видимому, клетки костного мозга кур — основная «мишень» трансформирующего действия вируса *in vivo* (Franklin et al., 1974).

Вирионы этой группы онкорнавирусов содержат 60—70S РНК и ферменты комплекса обратной транскриптазы, однако гомология между РНК вирусов группы ретикулоэндотелиоза и ALV отсутствует. Вирусы группы ретикулоэндотелиоза не интерферируют в культуре ткани с ALV, не могут служить вирусами-помощниками для дефектных штаммов RSV и, следовательно, не имеют общих клеточных рецепторов с ALV (см. подробно ниже). Не обнаружено комплементации, фенотипического смешивания или рекомбинации между вирусами этих двух групп; gs-1 антиген ALV общий для всех вирусов этой группы, не был обнаружен у вирусов группы ретикулоэндотелиоза.



Изучение перекрестной нейтрализации также не выявило общих антигенов в наружной мембране вирионов обеих групп вирусов.

Вирионы вируса ретикулоэндотелиоза построены из пяти основных белков, два из которых являются гликопротеидами; молекулярный вес этих белков (так же как и их антигенность) был отличен от такового белков ALV (Halpern et al., 1973, Maldonado, Bose, 1973; Kang, Temin, 1973). Пурчейз и др. (Purchase et al., 1973) подчеркивают и значительные морфологические различия вирионов ALV и группы ретикулоэндотелиоза.

Лейкозно-саркоматозные вирусы кур группы ALV разделены на пять подгрупп — А, В, С, D и E, в зависимости от свойств наружной мембраны; каждая подгруппа имеет индивидуальный типовой антиген(ы), который отражает различный спектр чувствительных к этому типу вируса линии кур и эмбриональных клеток цыплят *in vitro*. Это связано с тем, что каждой подгруппе соответствует определенный клеточный рецептор. Так, вирусы подгруппы А инфицируют только клетки, имеющие рецептор А-типа, подгруппы В — рецептор В-типа и т. д. Если же клетка утратила, например, рецептор А-типа, то она теряет при этом чувствительность к вирусам подгруппы А и т. д. Рецептор играет роль «входных» ворот и, по-видимому, принимает решающее участие в эклипс-фазе. Химическая природа рецептора неизвестна. Основываясь на этом признаке, фенотип клеток кур принято обозначать символами С/А, С/В, С/АВ и т. д., где буква в знаменателе обозначает подгруппу вирусов, к которой данный фенотип резистентен; обозначение С/О показывает, что такие клетки чувствительны ко всем известным вирусам саркомно-лейкозного комплекса кур. Каждый тип рецептора детерминирован одним доминантным (по чувствительности) аутосомальным локусом.

Были описаны четыре локуса — *tva*, *tvb*, *tvc* и *tve*, контролирующие чувствительность клеток к вирусам подгрупп А, В, С и E соответственно. Чувствительность доминирует над резистентностью. Опыты по скрещиванию кур с разными фенотипами по чувствительности показывают, что генетические локусы *tva* и *tvb* наследуются независимо и возможно даже локализованы в разных хромосомах, локусы *tva* и *tvc* связаны между собой. Для *tvb* описаны два аллеля чувствительности, один из них ассоциирован с антигеном эритроцитов. Чувствительность клеток к вирусам подгруппы E определяется двумя (или тремя) несцепленными генами (см. ниже).

Описанное разделение ALV на пять подгрупп в зависимости от типа клеточного рецептора полностью совпадает с иммунологической специфичностью основного антигена (gp-85) наружной мембраны вирусов этих подгрупп (в реакции нейтрализации) и спектром взаимной интерференции (см. Weiss, 1973).

*Взаимодействие вирусов  
лейкозно-саркоматозного комплекса кур*

В 1963 г. появилась первая публикация из серии работ Ханафуза с сотр. (Hanafusa et al., 1963), в которой по существу и создана та картина взаимодействия вирусов лейкозов и сарком птиц, которая в основных своих положениях оказалась верной и для вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса млекопитающих. Эти работы привели к открытию многочисленных вирусов-«помощников», позволили создать четкую классификацию вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса птиц и оказали громадное влияние на последующее развитие и разработку механизмов вирусного канцерогенеза. Ханафуза и др. (Hanafusa et al., 1963, 1964) показали, что клетки куриной эмбриональной ткани, трансформированные единичной частицей RSV-B, не выделяют полного инфекционного вируса Рауса. Иначе говоря, RSV-B, будучи способным трансформировать нормальную клетку в опухолевую, оказался дефектным по способности индуцировать в трансформированных клетках образование полного инфекционного вируса. Такие клетки были названы непродуцирующими. Они были онкогенны при введении цыплятам и образовывали большое количество gs-антигена лейкозов птиц. Далее Ханафуза и др. (Hanafusa et al., 1964) показали, что если трансформированную дефектным вирусом Рауса клетку куриной эмбриональной ткани, не образующую вируса в течение многих поколений, суперинфицировать вирусом (любым, как потом выяснилось) из группы лейкозов кур, то такая клетка начнет продуцировать полный инфекционный вирус Рауса. При этом большинство (если не все) клеток становилось вирус-продуцирующими, образуя одновременно два вируса — соответствующий лейкозный вирус и антигенно родственный ему вирус Рауса. Ни X-лучи, ни УФ-лучи, ни аметоптерин и митомицин С, ни любой из инфекционных миксовирусов подобным действием в этой системе не обладали. Вирус лейкоза, способный индуцировать в опухолевой клетке образование полного инфекционного вируса саркомы Рауса, был назван авторами вирусом-«помощником». Процесс индукции вируса Рауса вирусом-«помощником» был хорошо изучен: одной инфекционной вирусной частицы-«помощника» на клетку достаточно для индукции в ней вируса Рауса, первые зрелые частицы его появляются спустя 6—10 час. после инфекции. Активированная клетка продуцирует при этом в 5—20 раз больше вируса-«помощника», чем вируса Рауса. Процесс индукции не подавляется антагонистами синтеза ДНК и высокорезистентен к облучению. По-видимому, ДНК-зависимый этап синтеза вируса Рауса происходит еще в процессе трансформации клетки и не требуется для индукции.

Роль вируса-«помощника» в процессе индукции сводится к внесению им в клетку дополнительной генетической информации, необходимой для синтеза одного из белков оболочки вируса Рауса. Этот белок ответствен за специфичность реакции нейтрализации и определяет: а) чувствительность к интерферирующему действию лейкозных вирусов кур, б) спектр «чувствительности» вируса к генетически различным линиям кур, в) патогенность вируса для млекопитающих, г) кинетику образования вируса при индукции. По-видимому, все эти свойства поверхностного белка вирусной частицы взаимосвязаны и могут быть объяснены его важной ролью в эклипс-фазе.

Вирусные частицы, не содержащие этого поверхностного белка (рецептора), адсорбируются на клетке, но не могут войти в эклипс-фазу и начать таким образом инфекционный процесс (см. Vogt, 1965; Hanafusa, 1964; Weiss, 1973; Tooze, 1973).

Как уже было сказано, антигенность и спектр интерференции активированного RSV-B зависели от использованного вируса-«помощника». Разные «изоляты» вируса Рауса, активированного различными вирусами-«помощниками», получили название псевдотипов. Была обнаружена практически полная идентичность антигенности в реакции нейтрализации активированного RSV-B и спектра чувствительности его к интерферирующему действию того или иного лейкозного вируса кур, использованного в качестве вируса-«помощника»: интерференция была направлена только против того псевдотипа RSV, который был антигенно родственен с интерферирующим вирусом. Если вирус-«помощник», например, RAV-1, добавлялся одновременно с RSV или спустя какое-то время, то наблюдалась активация RSV. Если же вирус-«помощник» инфицировал клетки до RSV, то наблюдался феномен интерференции. Наиболее высокий уровень резистентности к RSV в этом случае был в 100—10 000 раз выше, чем в контроле (см. Vogt, 1965; Tooze, 1973). Яркий пример зависимости спектра чувствительных к RSV хозяев от вируса-«помощника» был представлен в 1966 г. Ханафуза и Ханафуза (Hanafusa, Hanafusa, 1966).

Штамм Брайен вируса Рауса практически полностью апатогенен для млекопитающих в то время как штамм Шмидт-Руппин высокопатогенен. Популяция последнего содержит «свой» вирус-«помощник», обозначенный RAV-50. Обмен вирусами-«помощниками» между этими двумя штаммами привел к получению штамма Шмидт-Руппин (RAV-1)-псевдотипа, непатогенного для млекопитающих, и RSV-B(RAV-50), высокопатогенного для хомячков и крыс.

Таким образом, сама вирусная частица штамма Брайен дефектна лишь по свойству индуцировать в зараженной клетке инфекционное потомство. Кроме штамма Брайен, в настоящее время известно еще несколько штаммов вируса Рауса, дефектных по

этому признаку. Однако дефектность присуща не всем штаммам. Имеется целый ряд штаммов вируса Рауса, недефектных по этому признаку. Они обладают способностью одновременно к трансформации и к продукции инфекционных вирусных частиц. Следовательно, в перmissive системе на уровне одной клетки возможна трансформация без продуктивной инфекции (дефектный штамм) и трансформация, сочетающаяся с продукцией полных инфекционных вирусных частиц (недефектные штаммы). Следовательно, неперmissивность системы клетка природного хозяина — вирус Рауса связана с геномом вируса. Интересно, что дефектность или недефектность штамма не влияет на частоту и выраженность трансформации клеток этими штаммами. Надо подчеркнуть, что недефектные штаммы RSV скорее всего лабораторный феномен. Природные штаммы, по-видимому, все дефектны (см. Vogt, 1965; Weiss, 1973; Tooze, 1973).

В неперmissive системе все штаммы вируса Рауса ведут себя как дефектные: клетки млекопитающих, трансформированные разными штаммами RSV, не продуцируют вирусных частиц (но синтезируют gs-ALV). Суперинфекция таких клеток ALV вирусами не ведет к активации («спасению») RSV (см. главу 7).

*Вирусы  
лейкозно-саркоматозного комплекса  
мышей*

В этом семействе вирусов различают вирусы, вызывающие саркомы мышей — MSV (Mouse Sarcoma Viruses), и вирусы, вызывающие различные формы лейкемии мышей — MuLV (Murine Leukemia Viruses).

Здесь мы лишь кратко характеризуем многочисленные лейкозные вирусы. Для удобства изложения мы считаем возможным разделить их на три группы:

1) вирусы — этиологические агенты «спонтанных» лейкозов мышей высоколейкозных линий (AKR, C-58 и т. д.); 2) вирусы — этиологические агенты лейкозов, первично-индуцированных различными физическими, химическими и биологическими агентами; 3) вирусы, вызывающие различные формы лейкозов, но выделенные из лабораторных штаммов перевиваемых солидных опухолей. В этом случае лейкозные вирусы являются лишь вирусами-«пассажирами» клеток таких опухолей, но не их этиологическими агентами.

*Вирусы «спонтанных» лейкозов.* Впервые вирус лейкоза мышей был выделен Гроссом в 1950—1951 гг. при введении бесклеточных экстрактов лейкемических тканей мышей высоколейкозной линии АК (AKR) новорожденным мышатам низколейкозных линий. Это открытие имело очень большое значение в проблеме



вирусного канцерогенеза, открыв по существу новую главу о вирусной этиологии лейкемии млекопитающих, и косвенно привело к открытию и выделению новой группы ДНК-содержащих онкогенных вирусов — группы Раова. Кроме того, Гросс впервые стал широко использовать в опытах новорожденных животных простой прием, которому исследователи в области вирусологии рака обязаны открытием и выделением онкогенных вирусов группы Раова, аденовирусов и других (см. Gross, 1970).

Частота «спонтанных» лимфом тимуса и лимфолейкоза у различных сублиний АКР колеблется от 60 до 90%. Средний латентный период возникновения лейкоза — около 10 месяцев. Характерно, но удивительно, что у высокоинбредных мышей линии АКР каждая тимомы и лимфолейкемия имеет свой тип дифференцировки, свои индивидуальные характерные особенности, которые сохраняются при трансплантациях. Возможно, что каждая тимомы АКР представляет собой моноклональную линию, а размножение и рост такого клона подавляют рост других клонов лейкоэмических клеток, возникающих в том же тимусе, — такая ситуация описана при возникновении сарком у мышей после имплантации им пластмассовых пластинок (см. Metcalf, 1971). Мыши разных линий поразному восприимчивы к лейкоэмическому действию вируса АКР; вирус АКР вызывал лимфатические лейкемии и при заражении новорожденных крыс.

Вирус АКР удается выделить от эмбрионов и на протяжении всей жизни животного. Опыты с гибридами F1 (АКР × чувствительная низколейкозная линия) показали, что вирус АКР передается вертикально, от родителей детям, причем как самками, так и самцами в равной степени. Через молоко вирус АКР практически не передается. Имплантация оплодотворенных яйцеклеток линии АКР мышам низколейкозной линии не меняла высоколейкозный статус потомства.

При серийных пассажах вируса АКР на новорожденных мышках линии СЗН был получен высокопатогенный вариант вируса — вирус Гросса А. Вирус был высокопатогенен для мышей и крыс, вызывая у них в большом количестве лимфолейкозы с коротким латентным периодом. Зараженные мыши СЗН передавали вирус потомству; основной способ передачи через плаценту и молоко. Однако этот способ вертикальной передачи не закреплялся в генерациях и постепенно, ко второй-третьей генерации, затухал. Инфицированные самцы СЗН заметным источником инфекции вируса не являются. Не удалось при инфекции мышак низколейкозной чувствительной линии высокопатогенным вирусом А получить из них стабильную высоколейкозную линию (см. Gross, 1970).

Сходные с вирусом АКР вирусы, вызывающие лимфолейкозы, были выделены от мышак других высоколейкозных линий (на-

пример, С58) или от низколеukoзных мышей со спонтанным лимфолейкозом (вирус В/Т-Л, выделенный из спонтанной лимфомы мышей линии BALB). Все эти вирусы антигенно и по многим другим биологическим свойствам были близки вирусу AKR (Gross, 1970; Tooze, 1973).

*Вирусы индуцированных лейкозов.* Гросс был и первым среди тех, кто доказал вирусную этиологию лейкозов, индуцированных облучением. Из лейкоэмических органов мышей линий С3Н и С57ВВ с лейкозом, вызванным тотальным облучением X-лучами, он выделил вирус, который вызывал при введении новорожденным мышам линии С3Н в основном лимфолейкозы примерно у 10% животных. При последующих пассажах вируса на новорожденных мышках линии С3Н патогенность его резко повысилась (индукция лимфолейкозов у 60—100% мышей линии С3Н). Этот вирус был назван Гроссом как вирус X (см. Gross, 1970).

Опыты Гросса были воспроизведены, подтверждены и расширены Либерман и Кэпланом (см. Kaplan, 1967), которые при тотальном, дробном облучении X-лучами мышей низколеukoзной линии С57ВВ получили у 80—90% животных лимфатические лейкозы. Из лейкозных тканей был выделен вирус, названный авторами вирусом радиационного лейкоза (RadLV — Radiation Leukemia Virus). После пассирования на новорожденных мышках линии С57ВВ лейкозогенность RadLV резко повысилась, и в настоящее время RadLV вместе с вирусом Гросса — один из самых изученных штаммов лейкозогенного вируса мышей (Kaplan, 1967).

Впоследствии лейкозогенные вирусы были многократно выделены из тканей мышей с различными формами лейкозов, индуцированных облучением или химическими канцерогенами. Из них наиболее изучены вирусы, описанные Латарже и Дюплэном, Дженкинсом и Аптоном, Любанским, З. А. Постниковой и Л. А. Зильбером, А. И. Агеенко и другими (цит. по Бергольц, 1973). Напомним читателю, что, по-видимому, впервые выделить онкогенный вирус из опухолей, индуцированных канцерогеном, удалось в 1944 г. (Зильбер, 1968).

Активация вирусного лейкоза у мышей и крыс (Агеенко, 1965, 1969) химическими и физическими факторами — в настоящее время твердо установленный факт, хотя конкретный механизм активации изучен недостаточно. Имеющиеся данные позволяют думать, что активация лейкомогенного вируса и индукция лейкоза — сложный и многокомпонентный процесс, быть может, различающийся по своему механизму в разных линиях мышей, который может включать в себя индукцию и синтез инфекционного вируса у облученных мышей, мутации индуцированного вируса, нарушение клеточных факторов, контролирующих экспрессию вирусного генома, подавление или извращение иммунной

реактивности облученных животных, изменения в динамике клеточных популяций лимфоидных клеток и т. д. (см. Gross, 1970, Kaplan, 1967). В заключение этого раздела отметим, что не только химические и физические факторы, но и биологические агенты оказались способными активировать лейкомогенные вирусы мышей. По-видимому, первая работа такого плана принадлежит Н. П. Мазуренко (1962). При введении новорожденным мышам низколейкозной линии С57ВВ вируса осповакцины примерно у 20% мышей развивались лейкозы (гемоцитобластоз, ретикулез и миелобластоз).

Выделенный вирус вызывал лейкозы (в основном гемоцитобластозы — ретикулезы) у мышей разных линий и у белых крыс. Вирус Мазуренко может передаваться от матерей потомству.

При введении мышам линии С57ВВ различных материалов от больных лейкозом людей В. М. Бергольц (1973) получил два типа лейкозных поражений — ретикулосаркоматоз и гемангиоматоз, которые перевивались бесклеточными материалами. Клетки опухолей содержали типичные вирусные частицы С-типа.

Индукция различных лейкозов экстрактами органов больных лейкозом людей у мышей разных линий, у крыс и морских свинок многократно описана в 50-е годы. Сводку литературы по данной проблеме читатель найдет в монографии В. М. Бергольца (1973); по-видимому, во всех этих случаях речь идет об активации латентных вирусов мышей тканевыми экстрактами человека. Механизм этого феномена практически не изучен.

Отметим также следующее: подавляющее большинство спонтанных или первично индуцированных лейкозов у мышей — лимфомы тимуса или диссимилированные лимфолейкозы и лимфосаркомы, значительно менее часты стволовоклеточные или миелоидные формы, практически не встречается эритробластоз. При этом большинство выделенных штаммов вирусов лимфолейкоза являются вариантами или сублиниями вируса лейкоза Гросса.

*Роль тимуса  
в патогенезе  
вирусных лимфолейкозов мышей*

Тимэктомия предотвращает развитие лимфолейкоза как у мышей так и у крыс (см. Miller, 1961). Наиболее детально этот вопрос изучен на модели спонтанного лейкоза мышей линии АКР. Вирус АКР может размножаться в разных органах и в разных типах клеток мышей, включая фибробласты, и даже в клетках опухолей, индуцированных другими вирусами или канцерогенами. Однако основная клетка-мишень трансформирующего действия вируса Гросса — незрелые лимфоидные клетки тимуса — тимоциты, а основной орган-мишень — тимус.

Тимус состоит в основном из двух типов ткани: особой эпителио-ретикулярной стромы, в петлях которой находится громадное количество незрелых лимфоидных клеток — тимоцитов. Одно из возможных объяснений роли тимуса заключается в том, что клетки его являются единственными «мишенями» трансформирующего действия вируса. Прямое введение вируса в тимус примерно в 100 раз более эффективно для индукции лимфолейкоза, чем любой другой способ введения. Однако возможно, что и лимфоидные клетки периферических органов могут сохранять свою чувствительность к трансформирующему действию вируса. Кроме того, инфицированные тимоциты могут, по-видимому, так же как и в норме, довольно быстро мигрировать в лимфоузлы, селезенку и т. д. Неудивительно поэтому, что часто вирусные или другие лимфомы (при которых, однако, четко выражен эффект тимэктомии) первично возникают не в тимусе, а в периферических лимфоидных органах.

Механизм лейкозной трансформации и ее этапы неясны, и выяснение их пролило бы свет на многие вопросы патогенеза лимфолейкоза. Действительно, с момента рождения (и даже в последнюю четверть эмбрионального развития) в тимусе обнаруживаются самыми разными методами значительное количество инфекционного, биологически активного лейкозного вируса. Одновременно в избытке имеются клетки-мишени, но лейкозная трансформация, в том виде, в каком мы ее определяем как лейкозную (способность пассироваться, метастазировать и т. д.) возникает на 8—11 месяце — парадокс, который пока не имеет объяснения.

Неонатальная тимэктомия практически полностью подавляет развитие лейкоза у мышей линии АКР, столь же эффективна тимэктомия в возрасте 1—3 месяцев. Для понимания механизма влияния тимуса на лейкомогенез существенно, что тимэктомия, даже неонатальная, не подавляла размножения лейкозного вируса в органах оперированных животных и не влияла на передачу вируса потомству. Удаление тимуса у нескольких поколений мышей подряд не превращало высоколейкозную линию мышей в низколейкозную, и наоборот. Тимэктомия не влияла на рост перививаемых лейкозов.

Подсадка сингенного или изогенного тимуса восстанавливала, хотя и не полностью, чувствительность мышей к индукции лимфолейкозов. Более эффективной была подсадка не одного, а 5—10 тимусов одному оперированному животному. Трансплантат оказывал свое лейкозогенное «действие» даже при подсадке спустя 6 месяцев после тимэктомии. Интересно, что во многих случаях трансплантат не являлся исходным местом развития лейкоэмического процесса.

Ни бесклеточный экстракт тимуса, ни взвесь тимоцитов, ни взвесь лимфоидных клеток взрослых животных не восстанавлива-



ли чувствительности к лейкомогенезу. Столь же неэффективна была подсадка тимуса в диффузионной камере (см. Metcalf, 1966; Miller, 1961, 1967).

В пользу того, что ингибирующее действие тимэктомии не может быть объяснено только удалением клеток-мишеней, чувствительных к опухолевой трансформации вирусом, говорят и результаты генетического и цитологического анализов: лимфомы, образующиеся у тимэктомированных мышей с трансплантированным тимусом, в большинстве случаев возникают из лимфатических клеток тимэктомированного реципиента, а не из клеток трансплантата тимуса.

Лимфондные клетки трансплантата тимуса быстро (в течение 3 недель) замещаются клетками реципиента. Однако тимоциты донора также жизнеспособны и участвуют в формировании лимфатической системы реципиента, что приводит к возникновению лимфатических химер. Это проливает свет на генотипическую «мозаику» лимфом, возникающих как из клеток донора, так и из клеток реципиента. В согласии с последовательностью смены клеточной популяции в эксплантате тимуса «ранние» лимфомы возникают, как правило, из клеток донора, «поздние» — из клеток реципиента (Metcalf, 1966; Kaplan, 1967; Miller, 1967).

Все эти факты говорят по крайней мере о двойственном влиянии тимэктомии на лейкомогенез: прямом — удалении или снижении числа клеток-«мишеней», чувствительных к малигнизации, и опосредованном, связанном, по-видимому с эпителио-ретикулярной стромой тимуса. Либерман и Каплан (см. Kaplan, 1967) в оригинальных опытах попытались получить данные о значении различных тканевых компонентов тимуса в вирусном лейкомогенезе. Ткань тимуса трансплантировали под капсулу почки. В качестве реципиентов служили тимэктомированные и облученные гибриды  $F_1$  мышей линии C57BL, BALB или C3H. Спустя неделю после трансплантации прямо в такой имплантированный тимус вводили суспензию тимоцитов, инфицированную *in vitro* вирусом RadLV. Генотип лимфом, возникших в трансплантате, определяли прививкой их мышам родительской линии.

При сочетании: реципиенты  $F_1$  (BALB  $\times$  C57BL), трансплантат тимуса от BALB, инфицированные тимоциты от C57BL, из 35 возникших у реципиентов  $F_1$  лимфом генотип их был C57BL — у 15, BALB — у 12 и  $F_1$  — у 8 из них. Не отмечено разницы при введении тимоцитов от новорожденного или 30-дневного донора.

Возраст донора трансплантата тимуса имел важное значение: при введении инфицированных тимоцитов новорожденного в трансплантат тимуса от взрослого животного лимфомы не возникали. Это подтверждается и другими опытами, когда частота возникновения лимфом из необлученного тимуса, трансплантированного

облученной мыши, определялась в большей степени возрастом донора (чем моложе, тем чаще), нежели возрастом реципиента.

Прямое введение вируса (без тимоцитов) в трансплантат тимуса дало опухоли генотипа BALB в 7 случаях из 10 и F<sub>1</sub> — в 3 случаях из 10. Введение инфицированных перитонеальных клеток вместо тимоцитов дало практически тот же результат, что и введение одного вируса.

Введение инфицированных тимоцитов непосредственно под капсулу почки при отсутствии трансплантата тимуса не вызывало образования лимфом. При жизнеспособном трансплантате количество лимфом не снижалось, даже если инфицированные тимоциты вводили не в трансплантат тимуса, а в селезенку. Облучение трансплантата тимуса рентгеновскими лучами в дозе 3000 r *in vivo* или *in vitro* перед имплантацией подавляло индукцию лимфом. Количество лимфом резко снижалось также, если тимоциты брали от мышей линии, резистентной к вирусу. То же влияние оказывала и линейная принадлежность трансплантата и реципиента (см. Kaplan, 1967; Metcalf, 1974).

Интересные данные были получены и на иммунологически толерантных мышах: мыши линии AKR искусственно толерированные к тканям СЗН (резистентная линия), после удаления собственного тимуса и трансплантации им тимуса от мышей СЗН ведут себя как низколейкозные мыши. Обратная постановка опыта значительно повышала число лимфом у СЗН. Трансплантаты тимуса от мышей линии AKR в 2—3 раза повышали частоту лейкозов у нетимэктомированных резистентных гибридов F<sub>1</sub> (AKR × C57BL). Почти все возникшие лейкозы приобретали генотип гибрида F<sub>1</sub> (Miller, 1967).

Гайс (Hays, 1966) в качестве трансплантатов использовала тимусы новорожденных, полностью лишенных тимоцитов кортикального слоя предварительной имплантацией их в диффузионных камерах в перитонеальную полость мыши. В качестве реципиентов использовали тимэктомированных мышей высоко- и низколейкозных линий (соответственно AKR и СЗН). Трансплантат инфицировали *in vitro* вирусом Гросса и имплантировали изолированным мышам. Лимфомы, первично возникшие в трансплантате, появились у 11 из 17 мышей линии AKR. У мышей линии СЗН лимфомы не возникли ни в одном случае. Если тимэктомированные мыши линии СЗН получали неинфицированный трансплантат тимуса линии AKR, то лейкемии также не возникали. Однако лейкемии развились у 18 из 19 мышей линии СЗН, неонатально инфицированных вирусом и тимэктомированных, а спустя 5 дней после инфекции получивших трансплантат неинфицированного тимуса линии AKR.

На основании этих опытов очевидно, что место действия факторов, определяющих чувствительность к лейкомогенезу,—

главным образом сама ткань тимуса, причем оба ее клеточных компонента: эпителио-ретикулярная строма и незрелые лимфоциты.

Изложенные факты позволяют схематически представить себе роль тимуса при лейкопогенезе следующим образом: тимоциты (в основном) и, возможно, периферические лимфоидные клетки являются непосредственными клетками-мишенями трансформирующего действия вируса. Для реализации этой способности вируса или лимфоидной клетки необходимы фактор или факторы, связанные с жизнедеятельностью эпителио-ретикулярной стромы железы. По-видимому, необходим довольно тесный контакт инфицированных лимфоидных клеток с клетками стромы. Поскольку активное деление лимфоидных клеток в тимусе ограничивается исключительно корковым слоем, можно допустить существование там особых регуляторов роста тимоцитов. Сравнение иммуногенных и лейкопогенных факторов тимуса не дает оснований говорить об их идентичности: иммунологический статус тимэктомизированных животных восстанавливался при введении им лимфоидных клеток взрослых мышей или тимуса как в диффузионной камере, так и под капсулу почки, в то время как чувствительность к лейкопогенезу не восстанавливалась. Тимусные экстракты, обладающие выраженным лимфоцитстимулирующим действием, также были неактивны в этом отношении. Факторы, восстанавливающие иммунологический статус, не только не обладают линейной специфичностью, но и не видоспецифичны. Лейкопогенный же фактор тимуса видоспецифичен и генетически детерминирован. Однако не исключено, что все это вызвано лишь различиями в количестве тимусного фактора, необходимого для обоих процессов (см. Metcalf, 1966, 1971).

Возможно, что лимфомные клетки требуют для своего роста постоянно действующего и высококонцентрированного «активатора», образующегося в тимусе. Иными словами, мы имеем в этом случае аналог гормонозависимой опухоли, требующей для своего роста определенной концентрации специфического гормона. Не исключена возможность, что тимусный фактор участвует или вообще необходим и для процесса неопластической трансформации лимфоидной клетки вирусом. В течение клеточных пассажей на животных такие тимусзависимые лимфомы приобретают «независимость».

Статус дифференцировки тимических лимфоидных клеток может явиться важным детерминирующим фактором в чувствительности клеток к вирусу или к активирующему действию тимуса. Это одно из возможных объяснений высокой восприимчивости новорожденных к вирусу.

Недифференцированные лимфоидные клетки присутствуют в нормальном тимусе мышей низколейкозных линий только в тече-

ние 1—2 недель после рождения (период чувствительности к вирусу) (Metcalf, 1966, 1971).

Изучение патогенеза вирусных лимфолейкозов, индуцированных облучением, показало, что лимфомы тимуса возникают лишь при тотальном облучении животных. Локальное облучение тимуса к развитию лимфом не приводит. Если облученным тимэктомированным гибридам  $F_1$  (C57BL $\times$ A) пересаживать тимус от необлученных мышей линии C57BL, то опухоли возникают даже при пересадке тимуса через 28 дней после облучения, причем как из клеток реципиента, так и из необлученных клеток трансплантата. Экранирование селезенки, костного мозга, внутривенное введение изологичных и гомологичных необлученных клеток костного мозга подавляло развитие лимфом. Подавляющей активностью обладали лишь живые неповрежденные клетки. Механизм защиты во многом неясен. Интактные клетки костного мозга могут стимулировать регенерацию тимуса после облучения, регулируя каким-то образом дифференцировку лимфобластов; не исключено, что защита в этом случае может быть связана с иммунологическими феноменами (см. Kaplan, 1967).

Помимо описанных выше штаммов вирусов лейкозов, выделено и описано несколько штаммов лейкозогенных вирусов и трансплантируемых опухолей (Gross, 1970; Бергольц, 1973).

**Вирус Граффи.** Граффи и его сотрудники, по-видимому, были первыми, кто предпринял систематические попытки выделить вирусный агент из перевиваемых клетками хорошо известных лабораторных штаммов опухолей мышей. Эти опыты привели к неожиданному для авторов результату: у инокулированных мышей возникали лейкемии вместо предполагаемых солидных опухолей.

Выделенный Граффи вирус вызывал у мышей линии Agnes-Bluhm, которую использовали авторы, миелоидные лейкемии, включая хлорлейкемию. Однако при введении вируса мышам других линий были получены и другие формы лейкоза — лимфолейкоз, стволовоклеточные лейкемии. Вирус Граффи передавался с молоком. У крыс вирус Граффи вызывал лимфатические лейкемии и лимфосаркомы.

**Вирус Молони** [MLV-Moloney (murine) Leukemia Virus] вирус, выделенный из «саркомы 37», лабораторного штамма спонтанной аденокарциномы молочной железы, который пассируется с 1907 г. на мышах разных линий. Вирус лейкоза Молони вызывает диссеминированные лимфосаркомы или генерализованные лимфатические лейкемии у мышей самых разных линий. После серийных пассажей патогенность вируса резко повысилась, и он стал вызывать лейкемии и при введении его взрослым мышам. Характер патологии, вызываемой этим вирусом у мышей, не отличим от такового, вызываемого вирусом лейкоза Гросса А. Тимэктомия предотвращала развитие лейкоза. Вирус Молони патоген-



нен для крыс, вызывая у них лимфосаркомы тимуса, и для хомячков — вызывает ретикулосаркомы.

Инфицированные мыши могут передавать вирус Молони с молоком.

**Вирус Френд.** Бесклеточные экстракты карциномы Эрлиха при введении их новорожденным мышам линии Swiss вызвали в опытах Френд значительное увеличение селезенки у подопытных животных. Эти селезенки и послужили источником для выделения нового лейкемогенного вируса (FLV — Friend Leukemia Virus), вызывающего необычное, ранее не описанное спонтанное заболевание мышей.

Выделенный Френд в 1957 г. вирус — ныне один из самых известных лабораторных штаммов вируса лейкоза мышей. При введении новорожденным и взрослым мышам ряда линий он вызывает характерный лейкемический синдром — увеличение печени и селезенки с выраженными изменениями периферической крови. Заболевание описано как эритролейкемия или эритробластоз (см. Gross, 1970).

**Вирус Раушера.** Несколько лет спустя Раушер (Rauscher) из асцитного варианта лимфобластомы Шварц — Скульмена выделил вирус, который при введении мышам-сосункам линии BALB вызвал у них увеличение селезенки и лимфоузлов. После пассирования на молодых мышках линии BALB патогенность вируса резко повысилась, и таким образом был получен еще один ныне хорошо известный и широко используемый штамм экспериментального вирусного лейкоза — вирус Раушера. У взрослых мышей чувствительных линий вирус Раушера (RLV — Rauscher Leukemia Virus) вызывает заболевание, по макро- и микроскопической картине не отличимое от эритробластоза, индуцированного FLV. У крыс FLV и RLV вызывают лимфатические лейкемии. Тимэктомия не предотвращает развитие эритролейкоза Раушера и Френд.

Последующее изучение FVL и RLV показало, что популяции обоих вирусов гетерогенны. При введении их крысам или мышам резистентных линий у инокулированных животных развивались лимфолейкозы или миелолейкозы. При использовании таких «неразрешающих» систем *in vivo* было показано, что стандартные препараты FLV и RLV содержат два типа вирусных частиц: одни — дефектные, вызывающие опухолевую трансформацию гематopoэтических клеток, но не способные размножаться без вируса-«помощника», и второй тип частиц, несущий функции вируса-«помощника». Последние представляют собой вирусы типа Гросса, вызывающие лимфолейкозы у мышей и крыс, или вирусы, вызывающие миелоидную лейкемию мышей (Dawson et al., 1968; Steeves et al., 1971; Fieldsteel et al., 1971; Bentvelzen et al., 1972; McGarry et al., 1974).

Сходный с RLV и FLV вирус был выделен Кирстеном и др. (Kirsten et al., 1967) из лимфомы тимуса мышей линии СЗН. Вирус Кирстена отличался от FLV и RLV своей способностью вызывать у крыс также эритробластозоподобное заболевание.

Попе (Pope, 1962) описал вирус, близкий по своим свойствам вирусу Френд, который был выделен в Австралии от диких мышей (*Mus musculus*) без признаков заболевания. Последующие работы Попе, а также Фрэнкса и др. (Franks et al., 1959), Фей и Граффи (Feu, Graffi, 1965) показывают, что вирус типа Френд в латентной форме, по-видимому, очень широко распространен в популяции мышей.

Вирусы Граффи, Молони, Френд, Раушера и Кирстен — излюбленные экспериментальные модели для изучения самых разных вопросов этиологии и патогенеза лейкемического процесса. Помимо этих вирусов из различных перевиваемых опухолей мышей, были выделены и описаны и другие вирусы, вызывающие различные формы лейкозов мышей, названные по имени авторов, которые их выделили. Это вирусы Стэнсли (Stansley), В. Н. Степной — Л. А. Зильбера, Абельсона (Abelson), Брейер—Молони (Breyer—Moloney), Е. Н. Пригожиной, Фрэнкса (Franks), Рудали (Rudali) и другие. Полный список этих вирусов и те факты, которые были получены при их изучении, можно найти в монографиях Гросса (Gross, 1970) и В. М. Бергольца (1973).

*Факторы, детерминирующие чувствительность клеток к MuLV.*

На основании спектра чувствительных клеток все известные лейкозные вирусы мышей разделены на две подгруппы В- и N-тропные (см. Lilly, Pincus, 1973). Прототип N-типа клеток — мыши линии NIH, прототип В-типа — мыши линии BALB (см. Pincus et al., 1971) — соответственно N- и В-тип клеток. В- и N-тропность MuLV определяется так же, как для ALV, в культурах фибробластов природного хозяина — мыши и основана на размножении или отсутствии размножения MuLV в этих двух типах клеток. Однако если в случае ALV резистентность или чувствительность данного штамма на разных типах клеток различается в 10 000—100 000 раз, то для MuLV она не превышает 50—1000 раз.

Скрецивание между В- и N-типами линий мышей показало, что один генетический локус контролирует чувствительность к обоим подгруппам MuLV. Резистентность доминирует над чувствительностью и, следовательно гибриды F<sub>1</sub> или гибридные клетки *in vitro* нечувствительны ни к В- ни к N-тропным штаммам MuLV.

В 1970 г. Пинкус и др. (Pincus et al., 1971) идентифицировали локус Fv-1, определяющий чувствительность мышей различных линий к инфекции FLV. При этом было показано наличие двух аллелей Fv-1 гена: Fv-1<sup>s</sup> и Fv-1<sup>r</sup>, определяющих соответ-

ственно чувствительность (s) или частичную резистентность (r) линии к вирусу. Пинкус и др. (Pincus et al., 1974) продемонстрировали, что система генов или ген, определяющий принадлежность к N- или В-типу мышей, идентичны Fv-1 системе и таким образом аллели Fv-1 гена должны обозначаться как Fv-1<sup>a</sup> и Fv-1<sup>b</sup>. Fv-1 локус локализован в четвертой хромосоме (группа сцепления VIII) и сцеплен с локусом Gpd-1, контролирующим фермент глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа: возможный порядок генов в этой группе сцепления: (локус, контролирующей окраску) — (Fv-1) — (Gpd-1) (см. Rowe, Sato, 1973).

N, В-классификация MuLV не коррелирует с серологической классификацией лейкозно-саркоматозных вирусов мышей, основанной главным образом на реакции нейтрализации или цитотоксичности. По этому признаку основные типы MuLV делятся на две группы — группу вирусов, серологически сходных по основному антигену наружной мембраны с вирусом Гросса (G-группа) и группу вирусов, серологически близких между собой, но отличных от вируса Гросса — FLV, MLV, RLV и др. (группа FMR).

В настоящее время серологическая классификация лейкозно-саркоматозных вирусов мышей по антигенам наружной оболочки еще только разрабатывается (см. Eckner, Steeves, 1972; Aoki, 1974). В них различают групповые, типовые и штаммовые антигены. Однако, по-видимому, основной антиген наружной мембраны, определяющий нейтрализацию вируса сывороткой, связан с гр-69/71 и не коррелирует, как уже было сказано, с N, В-типами лейкозного вируса.

Непермиссивность клеток по N- и В-тропности не обусловлена степенью или скоростью адсорбции вируса и связана с какой-то внутриклеточной стадией вирусной репликации (Krontiris et al., 1973), наступающей примерно через 10—12 час. после инфицирования (Tepnant et al., 1974a).

Контроль чувствительности и резистентности MuLV и ALV различается следующим образом (см. Weiss, 1973):

	ALV	MuLV
Спектр чувствительности	Соответствует мембранным антигенам вирионов	Не соответствует мембранным антигенам вирионов
Чувствительность	Детерминирована поверхностным рецептором клетки	Детерминирована внутриклеточным фактором (проявляется после «раздевания» вирионов)
Доминантность	Чувствительность	Резистентность
Локусы чувствительности	Различны для разных подгрупп (A, B, C, D и E) и независимы один от другого	Обе подгруппы (B и N) контролируются одним локусом и взаиморезистентны
Эффективность резистентности	Примерно 100 000	Примерно 50—1000

Бесклеточные экстракты непермиссивных по Fv-1 локусу клеток мышей подавляли размножение MuLV в пермиссивных по этому локусу клетках (Tennant et al., 1974).

Данные о типировании клеток мышей различных линий и спектре чувствительности их к В- и N-тропным лейкозным вирусам *in vitro* полностью совпали с данными, полученными *in vivo*. Все линии мышей Fv-1<sup>a</sup> генотипа были высокочувствительны к N-тропным вирусам, а Fv-1<sup>b</sup> — к В-тропным вирусам. Опыты с гибридами F<sub>1</sub>(Fv-1<sup>na</sup>, Fv-1<sup>bb</sup>, Fv-1<sup>nb</sup>) также подтвердили корреляцию чувствительности клеток мышей *in vivo* и *in vitro* и спектра чувствительных линий для N-, В- и NB-тропных вирусов (см. Lilly, Pincus, 1973).

Лилли и др. (Lilly, Pincus, 1973), изучая гибриды низко- и высоколейкозных линий соответственно В- и N-типа в разных вариантах скрещивания показали высокую степень корреляции между титрами инфекционного лейкозного вируса линии AKR (N-тропного) и частотой «спонтанных» лейкемий. Титр инфекционного вируса в этой системе был детерминирован Fv-1 геном. Более того, Fv-1<sup>na</sup> гомозиготы показывали высокий уровень экспрессии gs-1 антигена, в то время как Fv-1<sup>nb</sup> гетерозиготы — низкий уровень экспрессии gs-антигена. Не было найдено такой корреляции между титром вируса, экспрессией gs-антигена и типом H2 локуса гистосовместимости. Эти, а также ряд других данных показывают, что система генов Fv-1 может иметь определяющее значение в вирусном лейкомогенезе мышей (см. Lilly, Pincus, 1973).

N- или В-тропность различных вирусов группы MuLV — генетически стабильное свойство вируса, однако длительное пассирование *in vitro* В-тропного вируса в N-типе клеток приводило к появлению NB-тропного варианта. Аналогичные данные были получены и в опытах *in vivo*: при пассажах N-тропного вируса лимфатической лейкемии на мышах линии BALB наблюдалась его «трансформация» в NB-тропный вариант. Антигенность вариантов при этом не менялась. Не описана «трансформация» N-тропного варианта MuLV в В-тропный и наоборот (см. Lilly, Pincus, 1973).

Большинство лабораторных патогенных штаммов лейкозных вирусов одинаково хорошо размножались в N- и В-типе клеток и были определены как NB-тропные вирусы (см. Lilly, Pincus, 1973).

Ниже приведены данные о наиболее известных штаммах лейкозных вирусов мышей с обозначением их типа тропности (см. Lieber et al., 1974).

Вирус	Тропность	Вирус	Тропность
AKR	N	FLV	NB
B/T-L	B	RLV	NB
RadLV	B	KiLV	NB
MLV	NB	Вирус диких мышей	NB



Наличие нескольких «компонентов» (по крайней мере двух) в составе FLV, RLV и, возможно, других вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса мышей усложняет картину генетического контроля вирусной инфекции.

Вирусы лимфолейкозов, входящие в этот комплекс, контролируются системой генов Fv-1 (B-, N-тропность), описанной выше. Повторными пассажами FLV (или RLV) на крысах или мышках определенных резистентных к эритробластозному компоненту линий удается выделить первый компонент «комплекса» FLV — вирус, вызывающий лимфолейкоз LLV (Lympholeukemia Virus), патогенный для крыс. Основным методом титрования LLV *in vitro*, так же как и других вирусов лимфолейкоза мышей, — XC-тест (см. Klement et al., 1969, Rowe et al., 1970). XC-тест основан на способности этих вирусов, впрочем так же как и других вирусов лимфолейкоза млекопитающих, вызывать образование гигантских клеток и синцития в культуре клеток XC-крысиной опухоли, индуцированной RSV.

Основной способ определения эритробластозного «компонента» RLV или FLV-комплекса — увеличение веса селезенки или подсчет в селезенках инфицированных мышей числа отдельных «фокусов» пролиферации эритропоэтических клеток (см. Axelrad, 1965). Отсюда и другое название этого «компонента» — SFFV (Spleen Focus Forming Virus — вирус, образующий «фокусы» в селезенках).

Чувствительность мышей к SFFV регулируется локусом Fv-2. Мыши, гомо- или гетерозиготные по Fv-2 чувствительному аллелю этого гена (Fv-2<sup>ss</sup> или Fv-2<sup>sr</sup>) высокочувствительны к SFFV. Мыши, гомозиготные по рецессивному аллелю резистентности этого гена (Fv-2<sup>rr</sup>), — полностью резистентны (Lilly, 1970).

Чувствительность в этой системе доминирует над резистентностью.

Локус Fv-2 был локализован в группе сцепления II генома мышей, в том же районе, что и система поверхностных аллоантигенов H-7. Локусы Fv-2 контролируют действие только SFFV, но не определяют чувствительность или резистентность мышей *in vivo* или клеток мышей *in vitro* к LLV (см. Lilly, Pincus, 1973).

Резистентность к FLV, обусловленная Fv-2<sup>rr</sup> генотипом, не снимается кортизолом, тимэктомией или антилимфоцитарной сывороткой и, следовательно, не опосредована иммунологической системой В- или Т-типа клеток (Kumar et al., 1974); резистентность, детерминированная Fv-2 геном, опосредована М-типом клеток («центральный» лимфоидный орган этих клеток — костный мозг). Радиоактивный изотоп — стронций (<sup>89</sup>Sr), избирательно убивающий М-клетки, подавлял резистентность Fv-2<sup>rr</sup> мышей к SFFV; при этом число клеток-мишеней трансформирующего действия SFFV не менялось (Kumar et al., 1974).

Возможная схема действия Fv-2 типа генов, вытекающая из опытов Кумар и др. (Kumar et al., 1974), следующая: М-клетки «опознают» антигены, называемые гибридными или гемопоэтическими антигенами тканевой совместимости (Hh) молодых гематопоэтических клеток. Количество (экспрессия?) Hh антигена значительно (примерно в 10 раз) увеличено в клетках, трансформированных FLV. М-тип клеток контролирует количество Hh<sup>+</sup> клеток. Мыши линий C57BL, B10D2, C-58 (все Fv-2<sup>r+</sup>) резистентны к SFFV и дают одновременно быстрое отторжение трансплантата аллогенного костного мозга. В то же время мыши линий DBA/2, BALB (все Fv-2<sup>ss</sup>) дают слабый ответ на аллогенный трансплантат костного мозга. Не исключено, что резистентность к FLV (SFFV) и аллогенному трансплантату костного мозга детерминирована одной системой генов — Fv-2.

Таким образом, вирусы типа FLV и RLV представляют собой комплекс двух разных по патогенности и специфичности вирусов (LLV и SFFV), контролируемых двумя разными типами генов:

LLV	SFFV
Вызывает лимфоидную лейкемию	Вызывает трансформацию эритроидных клеток
Действует как вирус-«помощник» для дефектного FLV	«Дефектен» по способности давать инфекционное потомство
Размножение контролируется Fv-1 локусом	Трансформация контролируется Fv-2 локусом
Резистентность доминантна	Чувствительность доминантна

*Вирусы сарком мышей.* Сейчас известно три основных лабораторных прототипа MSV: MSV — Moloney (M) — MSV-M; MSV — Harvey (H) — MSV-H; MSV — Kirsten (Ki) — MSV-Ki — по фамилиям исследователей, впервые описавших эти вирусы. MSV-M был выделен от мышей линии BALB после инокуляции им высокой дозы MLV, в отличие от этого MSV-H и MSV-Ki были выделены от мышей, инокулированных не мышинными материалами, а плазмой или экстрактом крысиной лейкемии, в первом случае индуцированной MLV, а во втором — вирусом эритробластоза мышей (см. Gross, 1970). Как показали последующие молекулярно-биологические исследования, предварительное пассирование в этих случаях лейкозного вируса мышей на крысах оказалось существенным фактором в изменении биологических свойств исходных лейкемических вирусов мышей.

Позднее новый штамм MSV был изолирован Газдаром и др. (Gazdar et al., 1972) из спонтанной саркомы мышей F<sub>1</sub> (NZW × NZB)-MSV-Gz (Gazdar).

Разные штаммы MSV вызывают при введении поворожденным или взрослым мышам плеоморфные саркомы, такие как рабдомиосаркомы, веретено-клеточные или недифференцированные

саркомы. Вирусы сарком патогенны для крыс и хомячков, однако, штаммы MSV различаются по своей патогенности. Так, MSV-M практически не патогенен для крыс, а MSV-H высокопатогенен и для крыс и для хомячков. Часто этот штамм вируса вызывает сосудистые опухоли, а также кистозные поражения лимфоузлов и легких, сходные с описанными у крыс и кроликов, инфицированных RSV. MSV-Gz патогенен для крыс, хомячков и мастомис (см. Tooze, 1973).

Различные штаммы MSV оказались способными трансформировать *in vitro* эмбриональные фибробласты разных видов животных. При этом наиболее широким спектром трансформирующего действия обладал штамм Кирстена. Он трансформировал клетки самых разных видов животных (мышь, крыса, кролик, хомяк, морская свинка, свинья, корова, собака и человек) (см. Rhim et al., 1973).

Все препараты MSV содержали в избытке нетрансформирующие частицы С-типа, в ряде случаев обладающие лейкозогенным действием. Наличие таких ассоциированных с MSV вирусных частиц, обладающих свойствами вирусов-«помощников», было ответственно за индукцию лимфолейкоза или эритробластоза при введении различных препаратов MSV (см. Tooze, 1973).

Штаммы саркомных вирусов мышей MSV-M, MSV-H и MSV-Ki имеют лабораторное, «искусственное» происхождение. Выделение штамма MSV-Gz непосредственно из «спонтанной» опухоли мышей NZB — исключение, лишь подтверждающее общее правило, настолько искусственна и аномальна эта линия.

Существуют ли природные штаммы MSV? Впервые на этот вопрос пытались ответить Болл и др. (Ball et al., 1973). Вводя новорожденным мышам разных линий препараты вируса Раушера, свободные от MSV, авторы получили у них спустя 40—70 дней после введения рабдомиосаркомы или атипические гранулемы. Однако такой опыт, как это признают сами авторы, можно трактовать отнюдь не однозначно.

В 1966 г. Финкель и др. (Finkel et al., 1966) из спонтанной остеосаркомы мышей линии CF<sub>1</sub>/An1 выделили онкорнавирус С-типа FBJ.

Вирус FBJ содержал gs-1 антиген, характерный для вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса мышей; вызывал у новорожденных мышей некоторых линий остеосаркомы и саркомы мягких тканей, морфология которых резко отличалась от морфологии опухолей, вызванных разными штаммами вируса саркомы. Вирус FBJ вызывал опухолевую трансформацию эмбриональных клеток мышей и крыс *in vitro*, причем такие трансформированные клетки мышей обладали способностью к неограниченному росту. Препараты саркоматозного вируса содержали в громадном избытке нетрансформирующий вирус-«помощник». По спектру чувствитель-

ных клеток (N-тип) и по своим антигенным свойствам вирус FBJ был близок к группе лейкозных вирусов типа Gross (см. Levy et al., 1973).

*Взаимодействие вирусов  
лейкозно-саркоматозного комплекса  
мышей*

В 1966 г. Хартли и Роу (Hartley, Rowe, 1966) впервые показали возможность трансформации *in vitro* мышинных эмбриональных клеток MSV-M. Титрование большого количества различных препаратов MSV-M по способности образовывать «фокусы» трансформации *in vitro* показало сложный характер зависимости числа «фокусов» от дозы вирусов. При низких разведениях вируса число «фокусов» было пропорционально показателю разведения, но при более высоких разведениях число «фокусов» соответствовало уже квадрату фактора разведения («двуударная кривая»). Эти данные говорили о необходимости двойной инфекции клетки для индукции «фокусов» трансформации низкими дозами MSV. Когда же MSV титровали в избытке MLV, число образующихся «фокусов» было прямо пропорционально фактору разведения даже при низкой множественности инфекции клетки MSV. Вирус лейкоза Молони в этой системе являлся, таким образом, вирусом-«помощником». Некоторые «стоки» MSV-M содержали MLV в громадном избытке (в 100 или даже 1000 раз превышающем количество фокус-образующего вируса). В отличие от вируса Рауса MSV «требовал» в этой системе вируса-«помощника» не только для своего размножения или созревания, но и для индукции «фокусов» трансформации. •

В том же году Хюбнер и др. (Huebner et al., 1966) показали, что из клеток хомячковой опухоли, индуцированной MSV-M и не содержащей инфекционного вируса и даже его gs-антигена, можно «спасти» полный вирус MSV при кокультивировании опухолевых клеток в смеси с эмбриональными клетками мышей, инфицированными каким-либо (любым) лейкозным вирусом мышей. Прямое добавление лейкозного вируса к опухолевым клеткам не приводило к освобождению из них вируса саркомы: по-видимому, это было связано с неспособностью лейкозных вирусов мышей размножаться в хомячковых клетках.

В зависимости от того, какой лейкозный вирус был использован в опыте «спасения», урожай саркоматозного вируса нейтрализовался соответствующей типоспецифической сывороткой против лейкозного вируса.

По аналогии с вирусом Рауса, таким образом, были получены соответствующие псевдотипы вируса саркомы: MSV (MLV), MSV (RLV) в зависимости от использованного лейкозного вируса-«по-



мощника». Эти две работы и положили начало интенсивному изучению дефектности MSV и механизма «спасения» его из опухолевых клеток (см. Huebner, 1967).

Полный инфекционный MSV легко можно было «спасти» по описанному методу из целого ряда безвирусных опухолей крыс и хомячков, индуцированных различными штаммами MSV. При этом удалось получить индукцию полного вируса не только в смешанных культурах, но и прямой инфекцией опухолей крыс лейкозным вирусом *in vitro* или в опытах *in vivo* при непосредственном введении гетерологических опухолевых клеток мышам, ранее инфицированным лейкозным вирусом, или мышам высоколейкозных линий. Индукцию вируса можно было получить и при культивировании опухолевых клеток в смеси с клетками культур, хронически инфицированных лейкозными вирусами мышей. Способность к «спасению» вируса сохранялась безвирусными опухолями хомячков и крыс спустя большое количество пассажей их *in vivo* или *in vitro* или после многократных процедур клонирования (см. Huebner, 1967; Tooze, 1973).

Как и в случае вируса Рауса, спектр чувствительных к различным псевдотипам MSV клеток определялся вирусом-«помощником», но гистология вызванных различными псевдотипами опухолей детерминировалась геномом MSV. При активации одна и та же клетка продуцировала оба типа частиц и оба вируса появлялись одновременно. Келлофф и др. (Kelloff et al., 1974) показали, что при активации MSV лейкозным вирусом-«помощником» инфекционный вирус появлялся уже спустя 2 часа после гетерокарионизации трансформированной клетки с клеткой, хронически инфицированной лейкозным вирусом. Эти данные говорят о том, что блок онтогенеза вируса в опухолевой непермиссивной клетке происходит на самых конечных стадиях созревания вирусной частицы.

Проблема дефектности различных штаммов MSV была тщательно проанализирована. Так, было показано, что MSV, выделяемый непосредственно из опухоли мыши, не проявляет каких-либо признаков дефектности при титровании по образованию «фокусов» трансформации *in vitro*. В то же время типичная двугорбая кривая получалась при титровании того же штамма MSV, но полученного на ранних стадиях роста из инфицированных культур эмбриональной ткани мышей или линии 3Т3. «Урожай» вируса в этой системе на поздних сроках культивирования уже не проявлял признаков дефектности. Компетентность «раннего» урожая полностью восстанавливалась при добавлении к нему при титровании MuLV. Однако последующий анализ показал, что различные типы кривых титрования не могут быть объяснены только дефектностью MSV и избытком в «стоке» MSV лейкозного вируса-«помощника». Было показано, что в таких стоках присутст-

воляли и «компетентные» частицы MSV, способные образовывать «фокусы» без коинфекции с MuLV.

Три разные формы вирусных частиц, составляющих «сток» MSV: MuLV, «дефектный» MSV, «компетентные» частицы MSV — по-разному вели себя и в различных тканевых культурах. Физико-химическое изучение «компетентной» формы показало, что она имеет более высокий коэффициент седиментации, чем дефектная. Однако ультразвуковая обработка, не оказывая заметного влияния на дефектные формы MSV, переводила «компетентную» форму в дефектную. Более того, «компетентная» форма MSV могла быть получена и искусственно, *in vitro*, при совместном высокоскоростном центрифугировании дефектной формы MSV с MuLV. То же действие оказывало и замораживание-оттаивание концентрата обоих вирусов в растворе цитрата калия (Fischinger et al., 1969; Fischinger, O'Connor, 1970). Все эти и другие данные привели авторов к выводу, что «компетентная» форма MSV представляет собой «межвирусный» агрегат «дефектной» формы MSV и MuLV в одной вирусной частице.

Открытие межвирусных агрегатов и искусственное их получение при ультрацентрифугировании позволили обнаружить «искусственные» псевдотипы вируса саркомы. В 1969 г. Фишингер и О'Коннор (Fischinger, O'Connor, 1969) получили таким методом межвирусный агрегат MSV и FeLV (вирус лейкоза кошек) — MSV (FeLV). MSV (FeLV) размножался и трансформировал клетки кошек, но не клетки мышей; один пассаж такого искусственного межвирусного агрегата в клетках кошек приводил к образованию истинного псевдотипа MSV(FeLV), содержащего геном MSV и наружную оболочку FeLV и имеющего характерный для FeLV спектр чувствительных клеток. Полученный указанным выше методом псевдотип вируса саркомы — MSV(FeLV) активно размножался и трансформировал не только клетки кошек, но и различные культуры клеток собак, человека, что отражало свойства его вируса-«помощника». MSV (FeLV) вел себя в клетках кошек как дефектный вирус, и добавление FeLV к «стоку» резко увеличивало число «фокусов» трансформации. Получение в этой системе истинного псевдотипа MSV(FeLV) было подтверждено и в опытах по интерференции его с FeLV. Таким образом, хотя MSV и FeLV имеют различия в видовом отношении хозяев, они взаимодействуют один с другим *in vivo* (в клетках) и *in vitro* (при ультрацентрифугировании) с образованием соответствующего псевдотипа. Это свойство обоих вирусов, а также способность хорошо размножаться в различных тканевых культурах, легко преодолевая межвидовые барьеры, открывает перед исследователями широкие и очень интересные перспективы. В частности, оно было использовано для межвидового «спасения» генома MSV лейкозным вирусом кошек *in vitro*. В смешанных культурах без-

вирусных опухолей хомячков, индуцированных различными штаммами MSV, с эмбриональной тканью кошек, инфицированной FeLV, происходило «освобождение» генома с образованием дефектных псевдотипов MSV(FeLV). Полученные псевдотипы MSV имели характерный для FeLV спектр чувствительных клеток и спектр интерференции. Интересно, что опыты по «спасению» и в этой системе можно было проводить и *in vivo* непосредственно на котятках (Sarma et al., 1970). Из клеток человека, трансформированных MSV, саркомный вирус можно было «спасти» эндогенным вирусом кошек RD-114 (см. подробно ниже), для которого клетки человека — перmissive система (Parageorge et al., 1974).

Интересно, что саркоматозные вирусы птиц нельзя было активировать из клеток млекопитающих MuLV или другими лейкозными вирусами млекопитающих. По-видимому, это связано с невозможностью фенотипического смешивания или генетической рекомбинации между этими двумя типами вирусов. Возможность же активации генома MSV гетерологичным (по виду хозяина) вирусом-«помощником» создает предпосылки для попыток активации вирусов из саркоматозных клеток человека лейкозными вирусами животных.

Анализ феномена трансформации клеток MSV *in vitro* показал, что в условиях, исключающих реинфекцию клеток лейкозным вирусом-«помощником», или используя метод клонирования инфицированных MSV длительно пассируемых клеток в полужидком агаре, MSV сам без помощи лейкозного вируса может трансформировать клетки мышей, т. е. он не дефектен по этому свойству. Трансформированные таким образом клетки мышей активно размножаются, не содержат полного инфекционного MSV или MuLV, однако на протяжении сотен генераций они сохраняют геном MSV, который может быть «спасен» из них лейкозным вирусом-«помощником».

Клеточный тропизм репликации MSV детерминирован его вирусом-«помощником». Геном MSV в трансформированных клетках не несет В- или N-тропного маркера (Yoshikura, 1973).

Сравнительно недавно Болл и др. (Ball et al., 1973) описали две клональные линии клеток мышей, трансформированных MSV-M. Оба эти клона клеток продуцировали только вирионы MSV без вируса-«помощника», причем один клон продуцировал дефектный вирус MSV, трансформирующий клетки, но не способный размножаться в них, а другой клон постоянно продуцировал недефектный MSV, способный размножаться и трансформировать клетки мышей в отсутствие вируса-«помощника».

Все эти данные подчеркивают принципиальное сходство взаимодействия лейкозно-саркомных вирусов у двух разных видов животных — кур и мышей. Этот же тип взаимодействия дефектно-

го саркомного вируса и лейкозного вируса-«помощника» оказался общим и для лейкозно-саркомного комплекса других видов млекопитающих (хомячков, кошек, обезьян).

*Вирусы  
лейкозно-саркоматозного комплекса  
кошек*

Эти вирусы являются этиологическими агентами лимфоцитарной лейкемии, лимфосаркомы и фибросаркомы домашних кошек. Вирус лейкемии кошек FeLV (Feline Leukemia Virus) в лабораторных условиях вызывал лимфолейкоз у кошек и собак, а вирус, выделенный из фибросаркомы — FeSV (Feline Sarcoma Virus), — саркомы у кошек, собак, свиней, овец и нескольких видов обезьян (см. Jarret, 1972; Essex, 1972). Не исключено, что FeLV — этиологический агент и других заболеваний кошек — миелопролиферативных поражений, инфекционного перитонита, атрофии тимуса, фибром и некоторых анемий (см. Hardy et al., 1973). Вирус FeLV хорошо размножается, не вызывая каких-либо видимых изменений в клеточных культурах кошек и других видов животных; FeSV вызывает трансформацию *in vitro* клеток различных видов млекопитающих, включая кошек и человека (см. Jarrett, 1972). Оба вируса находятся в природных условиях в ассоциации, где FeLV играет роль вируса-«помощника» для дефектного вируса FeSV. Клетка-мишень трансформирующего действия FeSV — фибробласты; основное место размножения и, возможно, мишень трансформирующего действия FeLV — лимфоидные клетки костного мозга (Jarrett et al., 1973).

Отличительная особенность вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса кошек — их тесная и регулярная связь с встречающимися в природе лейкемиями и саркомами домашних кошек — большинство штаммов FeLV и FeSV, выделенных из таких спонтанных опухолей, были высоко патогенны. Все выделенные штаммы вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса кошек имели общий gs-1 антиген, но отличались по антигенам наружной мембраны. По этому признаку они были разделены на подгруппы А, В и С как на основании реакции нейтрализации, так и по тесту интерференции. Вирусы подгруппы А обычно встречаются в форме моноинфекции, в то время как вирусы подгрупп В и С часто встречаются в форме смешанной инфекции — А+В, А+С или А+В+С (см. Sarma, Log, 1973). Тип В в отличие от других типов FeLV имеет очень широкий спектр видов чувствительных клеток *in vitro* (человек, обезьяна, собака, свинья, хомячок и т. д.) для продуктивной инфекции.

Вирус FeLV широко распространен в популяции домашних кошек — у здоровых животных более чем в 40% обнаружива-



лись антитела к вирионным и вирусиндуцированным антигенам FeLV, а из органов и тканей здоровых (примерно 30%) и больных (примерно 50%) животных удавалось обнаружить и выделить инфекционный вирус. В то же время частота «спонтанного» возникновения лейкемии у кошек не превышает 0,05% — возможно, в связи с высоким «сероположительным» фоном популяции. Однако при этом неоднократно описаны групповые заболевания домашних кошек лейкемией например 11 (!) заболевших животных из 35 неинбредных кошек за 30-месячный период (см. Cotler et al., 1974). Вирус передается горизонтально — основной источник вируса при этом, по-видимому, слюна и моча инфицированных или больных животных (см. Jarrett et al., 1973). «Серонегативные» кошки, находившиеся в контакте с больными животными имеют в 900 (!) раз больше шансов заболеть лейкозом, чем неконтактировавшие. Индукция лейкоза при горизонтальной инфекции как котят, так и взрослых животных была подтверждена экспериментально (Hardy et al., 1973, Jarrett et al., 1973). Высокий титр природных антител к вирусу или вирусиндуцированным антигенам делает животных резистентными даже к громадным дозам FeLV—FeSV (см. Essex, 1972). По-видимому, существенную роль в резистентности кошек к онкогенному действию вируса играют антитела именно к мембранному антигену, индуцируемому вирусом в инфицированных клетках (Colter et al., 1974). Эти антитела от инфицированных матерей передаются потомству, которое приобретает резистентность к онкогенному действию FeLV.

#### *Вирусы лейкоза крупного рогатого скота*

В последние годы накапливается все больше и больше данных не только о вирусной природе лимфолейкоза крупного рогатого скота (см. Кукайне и др., 1974; Парфанович и др., 1974), но и получены прямые доказательства этиологического значения С-типа онкорнавирусов при этих заболеваниях. Из лейкозных клеток больных животных выделены характерные частицы С-типа, частота выделения таких частиц увеличивалась при обработке клеток фитогемагглютинином. В сыворотках больных животных в 90% случаев обнаруживаются преципитирующие и флуоресцирующие антитела к вирусным частицам. По предварительным данным, можно предполагать, что в основном это антитела к внутреннему (групповому?) антигену лейкозного вируса крупного рогатого скота. Не удалось обнаружить каких-либо общих антигенов у частиц С-типа из лейкозных клеток коров с другими типами и группами С-типа онкорнавирусов млекопитающих (Ferrer, 1972). У здоровых коров антитела, правда, значительно реже и в меньшем титре также были обнаружены. При этом отмечена прямая пропорциональность между частотой случаев лейкоза в данном

стаде и числом положительных на антитела к вирусу здоровых животных. Эти данные говорят о широком распространении лейкозного вируса крупного рогатого скота в популяции (Fegger et al., 1972, 1974). Антитела к вирусу, так же, по-видимому, как и сам вирус, могут передаваться через молоко. Частицы С-типа, выделенные из лейкозных клеток крупного рогатого скота, вызывали лимфолейкозы у телят и лимфосаркомы у овец при введении их новорожденным животным (Olson et al., 1972). Мак Клур и др. (McClure et al., 1974) показали, что 2 из 6 шимпанзе, которых они кормили молоком от больной лимфолейкозом коровы, в возрасте 34 и 45 недель умерли от эритролейкемии.

*Вирусы  
лейкозно-саркоматозного комплекса  
обезьян*

Характерный вирус С-типа был выделен Тиленым и др. (Theilen et al., 1971) из спонтанной фибросаркомы шерстистых (Woolly) обезьян Старого Света. Вирус SSV имел все признаки онкорнавируса, вызывал прогрессивно растущие опухоли у мартышек и трансформировал *in vitro* клетки разных видов млекопитающих, в том числе обезьян и человека. Вирус SSV-1 (Simian Sarcoma Virus) постоянно продуцировался как опухолевыми, так и трансформированными клетками в ассоциации с нетрансформирующим вирусом С-типа, антигенно идентичным SSV — вирусом SSAV-1 (Simian Sarcoma Associated Virus), выполняющим функции вируса-«помощника» для дефектного SSV. Патогенность SSAV для обезьян или других видов животных не обнаружена. Практически идентичный вирус SSV(SSAV) выделен из спонтанной лейкемии гиббонов Нового Света — GAL (Gibbon Ape Leukemia) (Kawakami et al., 1972).

В настоящее время описано уже несколько независимых изолятов вируса типа GAL от больных гиббонов. Вирусы типа GAL вызывают миелоидную лейкемию при введении нормальным гиббонам (цит. по Sherr, Todaro, 1975). Антигенно, по «поведению» *in vitro*, спектру интерференции и по данным молекулярной гибридизации GAL оказался весьма сходным с SSV(SSAV) (см. Дейнхарт, Дейнхарт, 1974). Однако Троник и др. (Tronick et al., 1975) показали, что эти два типа вирусов различаются между собой по антигенной характеристике белка р-12. Отличия по р-12 обнаружены и между разными штаммами SSV.

Вирусы типа SSV(SSAV) хорошо размножаются в клетках животных гомологичных видов, имеют общий gs-1 антиген, отсутствующий во всех других известных в настоящее время онкорнавирусах В- и С-типа млекопитающих, включая и вирусы обезьян. Особый интерес представляют данные, полученные в лаборатории

Галло, о наличии комплементарных участков нуклеиновой кислоты SSV с нуклеиновой кислотой «вирусных» частиц из лейкемических клеток человека. Более того, обратная транскриптаза из клеток от трех случаев острой миелоидной лейкемии человека оказалась антигенно сходной с обратной транскриптазой SSV (SSAV) и GAL (см. Miller et al., 1974).

Эти данные были подтверждены в другой лаборатории (Mak et al., 1975), где также было показано, что из клеток костного мозга больных лейкозом людей можно выделить частицы С-типа, РНК которых имеет 40—60% гомологии с РНК SSV. Галлахер и Галло (Gallagher, Gallo, 1975), Шерр и Тодаро (Sherr, Todaro, 1975) радиоиммунологическим методом обнаружили антигены, сходные с р-30 SSV в клетках миелоидной и гистиоцитарной формы лейкемии человека. Результаты этих исследований говорят о том, что вирусы группы SSV-GAL или близкие им могут играть этиологическую роль при определенных формах лейкемии человека.

Значительный интерес представляют данные Института экспериментальной патологии и терапии (Сухуми) об индукции лейкозных и лимфопролиферативных заболеваний у обезьян, при введении им крови людей, больных лейкозом (Лапин и др., 1973; Лапин, Яковлева, 1970; Яковлева и др., 1974).

*Аденоматоз (карцинома) легких овец  
(болезнь Jaagsiekte)*

Мы писали выше, что эту болезнь связывают и с вирусами типа герпеса и с «медленными» вирусами овец. Недавно появилось сообщение (Hod et al., 1974) об обнаружении в опухолевых клетках вирионов С-типа. Эта же группа авторов (Perk et al., 1974) выделила из опухолевой ткани частицы с плавучей плотностью 1,15—1,20 г/мл, содержащие обратную транскриптазу и 60—70S РНК.

Первые широкие исследования этиологии этого заболевания были предприняты еще в 50-е годы (см. Duran-Reynals, 1958). Позднее в лаборатории Л. А. Зильбера при введении бесклеточных экстрактов от больных овец лимфой мышей были получены своеобразные кистозные поражения лимфоузлов, сходные с кистозно-геморагической болезнью крыс, индуцированной RSV. Материалами от таких мышей у овец удалось индуцировать опухоли легких (см. Зильбер, 1962; Зильбер и др., 1962; Тер-Григоров и др., 1962).

## ОНКОРНАВИРУСЫ В-ТИПА

*Вирус опухоли молочных желез мышей*

Классический пример онкорнавирусов В-типа — вирус, вызывающий опухоли молочных желез мышей, — MTV, он же фактор молока, он же вирус Биттнера (Bittner) — по фамилии исследователя, обнаружившего впервые в 1936 г. в молоке мышей высокоракочной линии внехромосомный фактор, ответственный за индукцию опухолей молочных желез при вскармливании самками этой линии мышат низкоракочной линии. Литература, посвященная MTV (Mammary Tumor Virus), огромна и включает монографии, сводки, материалы многих специальных симпозиумов и обзоры. В списке литературы, помимо необходимых ссылок на оригинальные исследования последних лет, мы приводим три последних обзора по MTV (Bentvelzen, 1972; Blair, 1971; Nandi, McGrath, 1973), в которых дана основная литература и проанализированы различные проблемы, так или иначе связанные с MTV. Подробная сводка литературы приведена также Тузе (Tooze, 1973).

Исходной предпосылкой открытия MTV и прогресса в изучении его свойств явилось выделение и получение инбредных высокоракочных (по частоте «спонтанной» индукции опухолей молочных желез) и низкоракочных линий мышей. У высокоракочных линий (А, СЗН, GR, R-III, DD) частота «спонтанной» индукции опухолей колеблется от 60 до 100%, в зависимости от гормонального статуса животных. Так, большое количество опухолей наблюдается как у девственных, так и у рожавших мышей линии СЗН, хотя у последних оно всегда выше; у девственных мышей линии А количество «спонтанных» опухолей низкое (от 4 до 30%).

Опухоли у самцов высокоракочных линий возникают только после длительной обработки их эстрогенами; у самцов низкоракочных линий такая обработка к индукции опухолей не приводит. Активный вирус был обнаружен главным образом в нормальной молочной железе, молоке и опухолях мышей высокоракочных линий. Биологическая активность таких препаратов была связана только с В-типом вирусных частиц. Разные штаммы MTV различных высокоракочных линий мышей отличались по патогенности. Все эти штаммы содержали общий групповой (s-1 или gp-52) антиген (антигены), но различались по типовым (в реакции нейтрализации) антигенам. Вирус MTV обладает предельно узким видо- и цитотропизмом патогенного действия — он вызывает только опухоли молочных желез и только у мышей.

Три типа поражений молочных желез мышей связывают с действием вируса MTV:

1. Nodules — «узелки» — разрастания альвеолярного эпителия молочных желез, цитологически и гистологически идентичного



клеткам нормальной молочной железы. Клетки «узелков» содержат громадные количества инфекционного вируса MTV. «Узелки» не растут при пересадке их под кожу как девственным, так и беременным самкам, однако, если «узелки» пересадить в жировую подушку девственных самок, лишенную нормального эпителия молочной железы, то «узелки» будут расти, образуя структуры, идентичные нормальной молочной железе при беременности. При этом способе пересадки «узелки» можно пассировать в течение многих пассажей. Для роста «узелков» не требуется, в отличие от нормальной железы, стимуляции эстрогенами, в то же время гормоны надпочечника и гипофиза — необходимые факторы роста «узелков». Отдельные «узелки» «трансформируются» в карциному молочных желез. Частота и скорость трансформации зависит от многих причин, в том числе и от патогенности штамма MTV.

2. Plaque — «бляшки» — или гормонозависимые опухоли. Рост «бляшек» тесно связан с гормональным балансом самки. Опухолевые структуры «бляшек» сохраняют выраженные черты органодности и симметричности, присущие нормальной молочной железе. В жировой подушке девственных самок «бляшка» растет в виде нормальной молочной железы, однако пассироваться в отличие от последней она может серийно. При наступлении беременности «бляшка» сразу же приобретает характерные черты опухолевого роста, перенос такой опухоли девственной самке «нормализует» «бляшку». В отличие от «узелков», «бляшки» растут и при подкожной пересадке, но только беременным самкам. «Бляшка» содержит большое количество инфекционного MTV.

При росте «бляшки», как правило, лишь после 3—5-й беременности, в ткани ее появляются единичные «фокусы» атипичного роста, дающие начало третьему типу поражений молочной железы мышей, связанному с MTV, — карциноме. Рост карциномы молочных желез практически не контролируется гормонами или стромой (место пересадки — жировая подушка или подкожно — безразлично). Механизм трансформации «бляшки» или «узелка» в карциному не известен, однако показано, что такие факторы, как штамм вируса, гормональная стимуляция и генетические факторы организма, оказывают детерминирующую роль в этом процессе. Как правило, появление «фокуса» карциноматозных клеток монофокально в «узелке» или «бляшке». При этом такой «фокус» трансформации подавляет рост других «фокусов» карциноматозных клеток. По-видимому, каждая карцинома молочной железы характеризуется определенной степенью индивидуальности свойств и признаков (наряду с общими) (см. Bentvelzen, 1972; Nandi, McGrath, 1973).

Различают несколько штаммов MTV в зависимости от их патогенности и способа передачи. Вирус мышей высокораковых ли-

ний американского происхождения — А и СЗН получил название MTV-S (standard). С действием этого вируса и связано большое количество (в %) карцином молочных желез самок этих линий. Вирус в форме инфекционных частиц В-типа передается вертикально от матерей потомству через молоко; крайне редко отмечена передача его самцами со спермой. Передачу вируса через яйцеклетку обнаружить не удалось. MTV-S индуцирует в молочных железах чувствительных линий «узелки» с очень высоким потенциалом трансформации в гормоннезависимые карциномы. Однако если мышат высокоракковых линий (например, СЗН) вскармливают самки низкоракковой линии, то у таких животных, свободных от MTV-S — СЗНf (free), в поздние сроки возникают узелки с низким потенциалом трансформации в карциному. Из таких опухолей были выделены низкоинфекционные частицы В-типа, которыми удавалось заразить чувствительные линии. Такой низкоонкогенный вариант MTV-L (Low) или его синоним NIV (Nodule-Induce Virus) был обнаружен у всех мышей высокоракковых линий; при этом было показано, что, в отличие от MTV-S, MTV-L передается как самками, так и самцами в форме интегрированного генома в геноме половых клеток. В своей «природной» линии СЗН MTV-L лишь изредка передается через молоко, однако, если MTV-L заразить мышей высокочувствительной линии BALB, то последние передают MTV-L только через молоко. Интересный факт был отмечен при сравнительном заражении СЗНf и BALB вирусом MTV-L: мыши последней линии оказались более чувствительны к опухолеиндуцирующему действию MTV-L, чем СЗНf. Не исключено, что это связано с наличием в геноме мышей СЗНf интегрированного MTV-L, интерферирующего с «экзогенным» агентом (см. Bentvelzen, 1972).

Частота опухолей, индуцированных MTV-L, резко увеличивается у мышей мутантной линии СЗНА<sup>v</sup>JfB, что связано с наличием А<sup>v</sup>J гена. Одновременно у таких мышей резко повышены количество и скорость появления спонтанных гепатом.

Значительный вклад в понимание природы действия MTV и механизма его передачи был внесен голландскими исследователями при анализе высокоракковой линии мышей европейского происхождения — GR (100% «спонтанная» индукция опухолей в ранние сроки). Опухоли молочных желез в этой линии возникают из «бляшек» и содержат характерные частицы В-типа. Вирус MTV-P (Plaque) в этой линии передается не только с молоком, но, так же, как MTV-L, и со спермой и через яйцеклетки, однако, в отличие от низкоонкогенного штамма MTV-L, штамм MTV-P высокоонкогенен. Анализ передачи вируса внутри линии и F<sub>1</sub> гибридам GR и С57BL (резистентная линия) показал, что вирус MTV-P в одинаковой степени передается как самками, так и самцами. Вирус при этом передается в интегрированной форме

герминальными клетками любого из родителей как менделевский доминантный фактор. Геном мышей GR — необходимый фактор генетической передачи вируса: заражение мышей других линий вирусом MTV-P приводит только к «молочному» пути передачи вируса. MTV-P вызывает «спонтанные» опухоли молочных желез у всех европейских высококорковых линий мышей — GR, DD, R-III, но в двух последних линиях способ передачи его аналогичен передаче MTV-S — главным образом через молоко. Аналогично линии мышей СЗНf, R-III<sub>f</sub> более резистентны к заражению своим природным штаммом MTV-P, чем мыши других линий (см. Nandi, McGrath, 1973; Bentvelzen, 1972). Заражение мышей некоторых линий MTV-P приводит к индукции у них карцином молочных желез не только из «бляшек», но и из «узелков». Анализ этого феномена, проведенный Нанди и Гельмичем (Nandi, Helmich, 1974), привел авторов к мысли, что «бляшки» и «узелки» могут вызываться одним и тем же вирусом при действии на эпителиальные клетки молочной железы разных этапов дифференцировки.

Одна из особенностей MTV — его способность размножаться не просто в клетках нормальной молочной железы, но именно в эпителиальных клетках определенной стадии дифференцировки — начиная со стадии образования альвеол. В клетках нормальных молочных желез мышей высококорковых линий, получивших вирус или внутриутробно или в первые часы жизни с молоком, частицы В-типа удастся обнаружить, как правило, спустя несколько недель после рождения. Клетки первичных опухолей — главным образом «бляшки», сохранившие альвеолярную структуру, также являются продуцентами инфекционных частиц В-типа; опухоли, как правило, это злокачественные карциномы, утратившие альвеолярную организацию в процессе пассирования, одновременно утрачивают способность продуцировать частицы В-типа. Интересно, что частицы А-типа в клетках таких опухолей продолжают синтезироваться. Культуры эпителиальных клеток опухолей молочных желез начинают синтезировать частицы В-типа при добавлении инсулина и кортизола; при этом они образуют «дошес» («купола») — одно-двуслойные полые сферы, один из признаков дифференцировки эпителиальных клеток *in vitro*. Концентрация клеток, наряду с гормональной стимуляцией — один из факторов, детерминирующих образование «куполов». MTV обнаруживается главным образом в клетках этих сфер. Культуры неальвеолярных опухолей молочных желез под влиянием гормонов не образуют «куполов» и не продуцируют частиц В-типа. В большинстве первичных культур опухолей молочных желез продукция MTV невозможна без добавления гормонов, при этом синтез частиц В-типа, так же как и частиц С-типа, может индуцироваться йоддезоксигуанидином (IudR). Продукция MTV

в культуре клеток значительно усиливается дексаметазоном; действие этого синтетического гормона значительно повышает транскрипцию специфической вирусной РНК. В ткани же перевиваемых линий опухолей молочных желез образование частиц В-типа можно было наблюдать и без добавления гормонов (McGrath et al., 1972; Dickson et al., 1974).

Необходимо указать, что частицы В-типа были обнаружены не только в ткани молочной железы, но и в тимусе мышей линии NZB, опухолях легких мышей линии GR и опухолях мозга мышей линии C57BL. У самцов высокоракковых линий характерные частицы MTV обнаруживались в тканях половых органов. Размножение MTV имело место и у полностью мамэктомированных мышей (см. Bentvelzen, 1972). Значение этих находок не ясно. В большинстве случаев, когда частицы В-типа были обнаружены вне ткани-мишени, их биологическую активность не исследовали. По-прежнему единственная известная сейчас клетка-мишень трансформирующего действия MTV — эпителий молочной железы мышей. Однако биологическая активность MTV была обнаружена и в ядерных клетках крови и костного мозга мышей высокоракковых линий. При этом в таких клетках не удалось обнаружить образования частиц А- или В-типа. Этот тип вирусной активности был обозначен как MTV-B (Blood — кровь). Инфекционность MTV-B была связана только с интактными ядерными клетками — лейкоцитами и (или) гемопоэтическими стволовыми клетками лимфоузлов, тимуса, костного мозга, селезенки и в меньшей степени периферической крови. Облучение таких клеток X- или  $\gamma$ -лучами в дозе выше 1000p полностью подавляло биологическую активность MTV-B (для сравнения укажем, что инфекционность частиц В-типа MTV совершенно не уменьшалась после облучения дозой 5000—10 000 p) (Ардашников, Спасская, 1949; Nandi, Helmich, 1974a, b). Инфекция MTV-B-содержащими клетками интактных мышей зависела от способности этих клеток размножаться у инокулированных животных (Nandi et al., 1974).

Не вызывает сомнений, что природа связанного с клеткой MTV-B будет в ближайшее время выяснена; для этого у молекулярной биологии есть все возможности, и не исключено, что MTV-B находится в клетках в форме интегрированного вируса. Существенно, что активность MTV-B при искусственном заражении выявляется задолго до появления вирусных частиц В-типа в молочной железе. Возможно, что MTV-B — начальное и необходимое звено онтогенеза инфекционных вирусных частиц MTV в организме. Интересно, что чувствительность мышей к MTV-B, в отличие от MTV-S, тесно связана с H2-локусом.

Все штаммы MTV антигенно полностью отличны от всех известных онкорнавирусов В- и С-типа млекопитающих (Nandi, McFratb, 1973).



Разные линии мышей по-разному чувствительны к «спонтанному» и индуцированному MTV канцерогенезу опухолей молочных желез. Резистентность или чувствительность мышей разных линий к разным штаммам MTV может определяться многими факторами, различными для каждой данной линии. Это включает и генетические факторы, и гормональный баланс линий, и резистентность клеток-мишеней молочной железы, и резистентность гематопоэтических клеток, и зависимость от клеточного генома, и иммунологические факторы и т. д. (см. Nandi, McGrath, 1973).

#### *Вирус опухолей молочных желез обезьян*

Частицы В-типа связывают сейчас и с этиологией опухолей молочных желез обезьян. Чопра и Мэзон (Chopra, Mason, 1970) из спонтанной опухоли молочных желез обезьяны *M. rhesus* выделили вирус, морфологически сходный с В-типом частиц MTV, — вирус М-PMV (Mason-Pfizer Monkey Virus). Основные морфологические отличия М-PMV от классических частиц В-типа состоят в крайне выраженном полиморфизме зрелых вирионов М-PMV, их структурной нестабильности и отсутствии характерных отростков на наружной мембране вириона (Kramarsky et al., 1971; Manning, Hackett, 1972). Не обнаружено каких-либо общих антигенов у М-PMV с известными онкорнавирусами В- и С-типа млекопитающих, включая и вирусы обезьян (Nowinski et al., 1971; Ирлин и др., 1974; Ahmed et al., 1971).

Методами молекулярной гибридизации также не удалось обнаружить какого-либо сходства геномов М-PMV с другими онкорнавирусами С- и В-типа млекопитающих. Биохимические свойства обратной транскриптазы MTV и М-PMV сходны между собой, хотя полностью антигенно отличны (Yaniv et al., 1974).

Вирус М-PMV был выделен не только из опухолевой ткани, но и из нормальных молочных желез обезьян *M. rhesus*, плаценты и ткани эмбриона (Ahmed et al., 1974). Онкогенные свойства у М-PMV не обнаружены, однако этот вирус вызывал злокачественную трансформацию обезьяньих фибробластов *in vitro* (Fane et al., 1974).

#### *Онкорнавирусы В-типа человека*

Попытки обнаружить онкорнавирусы В-типа в опухолях молочных желез человека — по аналогии с опухолями молочных желез мышей — предпринимаются с 1950 г. и по сегодняшний день. Новые методы электронной микроскопии и молекулярной биологии заметно интенсифицировали эти попытки, и полученные результаты можно свести к следующему. В молоке здоровых женщин и женщин с опухолями молочных желез или опухолями

других локализаций, а также в молоке женщин из «высокоракковых» семей примерно с одинаковой частотой (около 10%) обнаруживаются вирусные частицы, морфологически сходные как с MTV, так и с M-PMV. Эти частицы имели плавучую плотность 1,18—1,22 г/мл, высомолекулярную РНК (35S или 70S), обладали обратнотранскриптазной активностью, причем фермент по своим биохимическим характеристикам был сходен с обратной транскриптазой MTV и M-PMV (Axel et al., 1972; Schlom et al., 1972, 1973; Moore, 1974). (В процессе исследований был установлен любопытный факт: женское молоко содержит фактор, разрушающий MTV (см. подробно Moore, 1974), что крайне затрудняет обнаружение вирусных частиц В-типа в образцах женского молока).

Природа обнаруженных в женском молоке частиц интенсивно изучается в настоящее время, правда, главным образом методами молекулярной биологии. Аксель и др. (Axel et al., 1972) показали, что 70S РНК из частиц с плавучей плотностью 1,16—1,19 г/мл из карциномы молочных желез человека (в 30 из 38 исследованных опухолей) давала определенную степень гомологии с РНК или ДНК MTV, но не RLV. Положительные результаты были получены и при гибридизации вирусспецифической ДНК частиц из женского молока с РНК из злокачественных опухолей молочных желез человека, но не с РНК нормальных тканей человека и мыши (см. Moore, 1974). Вейдиа и др. (Vaidya et al., 1974) исследовали нуклеотидные последовательности РНК в опухолях человека, комплементарные ДНК M-PMV и MTV. Из 22 исследованных опухолей молочных желез ни в одной не были обнаружены РНК, комплементарные M-PMV, в то время как 8 опухолей содержали РНК, уровень гибридизации которых с ДНК MTV составлял 18—77% (примерно от 1,5 до 8 молекул РНК MTV на клетку). В конце 1974 г. опубликовано сообщение лаборатории Спигельмана, в котором показано, что ДНК M-PMV гибридизовалась с полисомальной РНК примерно из  $\frac{2}{3}$  исследованных злокачественных карцином молочных желез человека. Этим положительным результатам противоречат данные других авторов, которые не смогли обнаружить какой-либо степени комплементарности между MTV и M-PMV и нуклеиновыми кислотами частиц женского молока или опухолей молочных желез человека (см. подробно Moore, 1974).

В ДНК нормальных клеток человека не было обнаружено участков, комплементарных РНК или ДНК как M-PMV, так и MTV (см. Parks et al., 1973; Moore, 1974).

Иммунологические исследования также пока не позволяют сделать окончательных выводов. Так, Чарней и Мур (Charney, Moore, 1971) показали, что примерно 25% сывороток как от здоровых женщин, так и женщин с опухолями молочных желез

содержит антитела, нейтрализующие MTV. Антитела, реагирующие в реакции иммунофлуоресценции с клетками перевиваемой опухоли молочных желез мышей, были обнаружены в сыворотках людей как с опухолями, так и у здоровых доноров (Priori et al., 1972). Специфичность реакции при этом не была определена. Миллер и др. (Müller et al., 1972) в сыворотках некоторых больных с опухолями молочных желез обнаружили антиген, сходный с MTV. Эти же авторы показали, что сыворотки некоторых женщин с опухолями молочных желез или фиброзно-кистозной мастопатией содержат антитела, реагирующие с частицами А-типа опухолей молочных желез мышей.

Имеются и другие данные, говорящие о возможном иммунологическом родстве антигенов опухолей молочных желез человека MTV (Moore, 1974).

Особый интерес представляет обнаружение М-PMV-подобных вирусов в перевиваемых клетках нормальных и опухолевых тканей человека (Ильин и др., 1972; Pyin et al., 1972; Быковский и др., 1973). Эти вирусы морфологически (Быковский и др., 1973) и физико-химически (Жданов и др., 1973) были идентичны М-PMV и содержали общий с ним группоспецифический антиген (Ирлин и др., 1974). Недавно полученные американскими исследователями данные о контаминации этих культур клетками HeLa (Nelson-Rees et al., 1974) и прямое выделение М-PMV-подобного вируса из клеток HeLa (Gelderblom et al., 1974; Bauer et al., 1974) поднимают вопрос о первоначальном источнике этих вирусов.

По-видимому, подобные вирусные частицы были обнаружены также в культурах опухолей почек (Elliot et al., 1973), в клетках перевиваемой линии клеток мозга (Hooks et al., 1972), в культурах лейкемических или меланомных клеток (Parsons et al., 1974) человека.

Общность — морфологическая, серологическая и биохимическая — М-PMV-подобных вирусов клеток человека с М-PMV, а также четкие отличия М-PMV от всех известных онкорнавирусов В- и С-типа млекопитающих позволили Быковскому и др. (Bykovsky et al., 1974) выдвинуть предположение о существовании особой подгруппы М-PMV-родственных онкорнавирусов приматов и человека (онкорнавирусы типа D).

\* \* \*

Более 60 лет назад открытием именно РНК-содержащего онкогенного вируса была начата новая глава онкологии — вирусная этиология опухолей, — и сегодня во многом благодаря изучению свойств РНК-содержащих онкогенных вирусов и механизма их действия на клетку мы являемся свидетелями поразительного

прогресса этого направления, ставшего ведущим в экспериментальной и теоретической онкологии.

Опухоли, индуцированные РНК-содержащими вирусами, широко распространены в природных условиях. При этом обращает внимание «монотонность» РНК-содержащих онкогенных вирусов: если среди ДНК-содержащих вирусов по крайней мере четыре различные группы вирусов обладают онкогенными свойствами, то среди РНК-содержащих вирусов при всей их многочисленности известна только одна группа вирусов — онкорнавирусы, — обладающая онкогенными свойствами.

Одна из наиболее вероятных причин такой уникальности этой группы вирусов — наличие у всех ее представителей 60—70S РНК и обратной транскриптазы. Только присущий онкорнавирусам тип репликации, связанный с образованием ДНК-провируса, может обеспечить интеграцию генома РНК-содержащего вируса в геном клетки — это необходимое условие наследственной опухолевой трансформации клетки онкогенным вирусом. В свою очередь эта уникальность и общность признаков позволяют говорить о каком-то едином «источнике» и пути происхождения различных онкорнавирусов у различных видов и классов животных.

Онкорнавирусы очень широко распространены в природных условиях. По крайней мере два типа передачи онкогенной инфекции мы можем констатировать для этой группы вирусов — горизонтальный и вертикальный. Горизонтальный тип передачи — путем контакта — характерен, например, для FLV или вирусов типа ретикулоэндотелиоза птиц. Эти вирусы высоко патогенны для природных хозяев, однако частота «природных» опухолей, индуцированных ими, минимальна. Высокий «иммунный фон» популяции на вирусные или вирусиндуцированные клеточные антигены, — по-видимому, основная причина резистентности популяции. Лишь в экзотических случаях, возможно, связанных с отбором, со снижением иммунореактивности или изоляцией, ведущей к появлению серонегативной популяции, могут возникать множественные случаи опухолевой болезни. Этот тип инфекции принципиально не отличается от типа передачи вируса в случае ДНК-содержащих онкогенных вирусов, и он несет в себе все черты (за исключением механизма взаимодействия вируса с клеткой) «банального» инфекционного заболевания, вызванного широко распространенным в популяции вирусом или микробом. Очевидно, что такой тип онкоинфекции вполне возможно будет предотвратить вакцинацией или пассивной иммунизацией.

Второй тип передачи, характерной для онкорнавирусов, — вертикальный: от родителей — потомству. Однако мы различаем два варианта передачи этого типа. Первый, когда инфекция передается вертикально инфекционными вирусными частицами (вирус опухолей молочных желез мышей MTV-S, вирусы лимфоматоза



птиц и др.). Вирус передается через плаценту, молоко, он может инфицировать плод в родовом пути матери и т. д.

Такой же тип передачи вируса характерен для многих «высокоракковых» линий, однако создается впечатление, что это скорее лабораторное «чудо», а не природный тип вертикальной передачи онкорнавируса. Такой тип вертикальной передачи характерен именно для мутантных вариантов «природного» штамма высококоракковых линий животных или при передаче вируса неестественной линией. При этом должна существовать очень высокая инфицированность матери для того, чтобы такой путь передачи имел место.

Второй тип вертикальной передачи — генетический, через гамету; при этом типе передачи инфекции самец и самка в равной мере могут служить источником вируса. Вирус передается в этом случае не в форме вирусных частиц: оплодотворенная яйцеклетка содержит инфекционное начало в виде ДНК-провируса, интегрированного в своем геноме. Этот путь передачи характерен для вирусов высоколейкозных линий мышей и для некоторых штаммов фактора молока. Он детерминирован определенной системой генов хозяина и имеет место только в природной для данного вируса системе. По-видимому, именно этот тип вертикальной передачи инфекции и определяет широкое, повсеместное распространение онкорнавирусов.

---

## Глава четвертая БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ОНКОГЕННЫХ ВИРУСОВ НА КЛЕТКИ

### ИНДУКЦИЯ СИНТЕЗА КЛЕТОЧНОЙ ДНК ДНК-СОДЕРЖАЩИМИ ОНКОГЕННЫМИ ВИРУСАМИ

В 1965 г., практически одновременно, три группы исследователей (Dulbecco et al., 1965; Weil et al., 1965; Winocour et al., 1965) обнаружили, что инфекция клеток РУ ведет к индукции в них синтеза клеточной ДНК. Аналогичные результаты были получены вскоре и для другого онкогенного вируса — SV40 (Hatanaka, Dulbecco, 1966; Gershon et al., 1966). Однако впервые этот феномен наблюдал Миновада (Minowada, 1964), но он не привел точных данных о природе такой ДНК, синтезируемой при полиомной инфекции, и поэтому право «первородства» досталось другим. Этот феномен привлекает к себе особое внимание исследователей еще и потому, что для «обычных» инфекционных вирусов известно лишь обратное явление — подавление синтеза клеточной ДНК при инфекции клетки. Возникает вопрос: является ли таким образом способность к индукции синтеза клеточной ДНК в процессе инфекции уникальной особенностью ДНК-содержащих онкогенных вирусов, их «патогномичным» признаком или, как это уже часто случалось, аналогичные факты будут получены и для «обычных» вирусов?

Индукция синтеза клеточной ДНК была описана всеми тремя группами авторов в сплошных однослойных первичных культурах почек мышей, где синтез ДНК почти полностью отсутствовал. Инфекция таких культур РУ вызывала резкий подъем (в 2—10 раз и более) синтеза клеточной ДНК по сравнению с идентичными контрольными культурами (Winocour, 1969; Tooze, 1973).

Этот феномен во времени предшествует синтезу вирусной ДНК и белков вирусного капсида и, следовательно, является «ранней» функцией вирусной ДНК. И для вируса SV40 и для РУ как в пермиссивных, так и в непермиссивных клетках она начинается после индукции синтеза ядерного Т-антигена (Hatanaka, Dulbecco, 1966) и продолжается даже во время синтеза вирусной ДНК и

белков капсида (Kit et al., 1967). Среднее количество синтезируемой клеточной ДНК на активированную клетку в продуктивной системе не меняется в зависимости от множественности полиоминой инфекции (Basilico et al., 1966) и приблизительно удваивается (Gershon et al., 1966).

Индукция синтеза клеточной ДНК в зараженных клетках происходит асинхронно, что зависит, вероятно, от стадии клеточного цикла, во время которого произошло инфицирование (Ben-Porat, Kaplan, 1967).

Индукция происходит именно в тех клетках, которые инфицированы РУ или SV40. При этом синтез ДНК идет как при острой продуктивной литической инфекции, так и в случае abortивной инфекции (в непермиссивных клетках), при которой не образуется полный вирус и не синтезируется ДНК вируса. В непермиссивной системе для индукции ДНК требуется высокая множественность инфекции РУ или SV40 (Vogt et al., 1966; Basilico et al., 1966; Gershon et al., 1966; Henry et al., 1966; Sheinin, 1966a, b); интерферон подавляет синтез такой ДНК вирусом как в пермиссивных, так и в непермиссивных клетках (Dulbecco, Johnson, 1970), это является еще одним подтверждением специфичности феномена для действия вируса.

Индукция синтеза клеточной ДНК РУ и SV40 коррелирует с синтезом гистонов (Shimono, Kaplan, 1969; Winocour, Robbins, 1970).

Индукция ДНК РУ и SV40 происходит и в клетках, репродуктивная способность и синтез ДНК в которых подавлены не только «сливным» ростом клеток, но и X-лучами (в дозах до 10 000 p), температурными факторами, аналогами нуклеиновых кислот или процессом «старения» культуры (см. Winocour, 1969).

Опыты с очищенными препаратами РУ показывают, что индукция ДНК вызывается именно инфекционными полными вирусными частицами, а отнюдь не примесями, «полыми» частицами или «псевдовирioнами» (см. Winocour, 1969). Прямыми опытами было доказано, что индукция клеточной ДНК вызывается интактной суперспирализованной молекулой ДНК вируса РУ. Эффект снимался при обработке ДНК вируса ДНК-азой (Rozenblatt, Winocour, 1971). Опыты по инактивации также показывают, что индукция синтеза ДНК зависит от функции вирусного генома. При этом, согласно кривым инактивации, количество генетической информации вируса, необходимое для индукции клеточной ДНК, составляет лишь часть полного генома вируса полиомы, соответствующего размерам участка его, необходимого для трансформации клетки (Gershon et al., 1965).

Процессу индукции клеточной ДНК предшествует активация синтеза специфических ферментов. Тот факт, что по крайней мере для 7—9 или более различных ферментов отмечено увели-

чение активности при инфекции клетки РУ или SV40 (см. Kit, Dubbs, 1969), делает маловероятной возможность, что все они кодируются вирусом. Активация ферментов, возможно, связана с нарушением «биохимического» гомеостаза клетки в результате инфекции и, как следствие этого, с отсутствием адекватной регуляции синтетических процессов (см. Winocour, 1969).

Отдельно отметим работы, посвященные индукции клеточной ДНК РУ и SV40 в миофибриллах (Yaffe, Gershon, 1967; Fogel, Defendi, 1967). Миофибриллы образуются *in vivo* или *in vitro* в результате слияния в процессе роста одноядерных миобластов, и для них характерно большое число ядер, в которых синтез ДНК и митоз репрессированы. Такие клетки находятся в конечной стадии дифференцировки, «вышли» уже из нормального клеточного цикла ( $G_0$ -фаза) и в нормальных условиях уже не способны к делению. Подавление синтеза ДНК в клетках происходит еще за несколько часов до начала слияния миобластов в миофибриллы. Полностью сформированные миофибриллы были резистентны к инфекции РУ (культуры мышечной ткани эмбрионов хомяков, крыс и мышей) и SV40 (культуры эмбриональной мышечной ткани человека). Миобласты же оказались чувствительными к инфекции. При этом инфицированные клетки сохраняли способность к слиянию и образованию многоядерных миофибрилл. В таких миофибриллах и происходил синтез клеточной ДНК. Одной из самых интересных проблем, возникающих из этих опытов, является синхронный синтез ДНК во всех ядрах внутри одной миофибриллы, даже если они были расположены достаточно далеко одна от другой. Такая синхронная индукция происходила, по-видимому, даже в том случае, если в состав миофибриллы входил лишь один инфицированный миобласт. Из этих опытов очевидно, что инфекция РУ или SV40 высокоспециализированных клеток выводит их из периода покоя ( $G_0$ ) в S-период (фаза синтеза ДНК).

Вслед за подъемом синтеза клеточной ДНК происходит спад его, причем он не вызван начавшимся синтезом вирусных ДНК или лизисом клетки; вновь образованная ДНК не реутилизируется в процессе продуктивной полиомной инфекции для синтеза вирусной ДНК (Weil et al., 1965).

Отмечена высокая нестабильность этой ДНК, однако деградирует вновь синтезируемая ДНК только после репликации ее в инфицированной клетке, притом до фрагментов, равных по молекулярному весу вирусной ДНК (Ben-Porat et al., 1967; Ben-Porat, Kaplan, 1967). Не исключено, что в часть вирусных капсидов включаются именно эти фрагменты, образуя при этом неинфекционные «псевдовирсоны». Однако имеются данные (Branton, Sheinin, 1968), которые не согласуются с результатами, полученными Бен-Порат и сотр. (Ben-Porat et al., 1966). Из этой



работы следует, что если клетки растущей культуры мышинной эмбриональной ткани инфицировать низкими дозами РУ, то в течение первых 12 час. после инфицирования происходит синтез нормальной клеточной ДНК. Спустя 12 час. начинается синтез вирусной ДНК, а затем происходит индукция клеточной ДНК. Эта ДНК отличается по своему молекулярному весу от нормальной клеточной ДНК. Хотя вновь синтезируемая ДНК так же чувствительна к тепловой денатурации, как и нормальная клеточная ДНК, ее молекулярный вес в среднем ниже, чем у последней. При этом была отмечена значительная гетерогенность этой новой ДНК, варьирующая от молекулярного веса, идентичного нормальной клеточной ДНК, до фрагментов с молекулярным весом менее половины ее. При седиментационном анализе в щелочной зоне рН было показано, что такая новая ДНК двуспиральна, но содержит разрывы во вновь синтезируемой нити. Аномальная ДНК возникает в клетке только в результате репликации новой ДНК непосредственно в процессе инфекции. При этом появление такой аномальной ДНК по времени связано с началом синтеза вирусной ДНК (Cheevers et al., 1970a, b). Авторы высказали предположение, что регуляция синтеза клеточной ДНК в инфицированных РУ клетках связана с образованием вирусной ДНК и является «поздней» функцией вируса. Для проверки этого предположения они изучили динамику синтеза ДНК в инфицированных клетках, обработанных циклогексимидом (ингибитором синтеза белка), рассчитывая таким образом отделить «поздний» белковый синтез от «ранних» функций вирусного генома. При этом было показано (Branton et al., 1970), что при подавлении образования «зрелой» сверхзакрученной формы вирусной ДНК образование аномальной клеточной ДНК также подавлено.

Последующий анализ появления и свойств клеточной ДНК в процессе продуктивной полиомной инфекции, проведенной этой же группой авторов, показал, что индукция ДНК предшествует началу синтеза вирусной ДНК — разрыв равен приблизительно 3 часам, а по времени происходит между 15—18 часами после инфицирования. Новая клеточная ДНК, синтезируемая в этот момент, двуспиральна, и обе ее нити осаждаются гомогенной зоной при 105 000 g в щелочном растворе сахарозы. Спустя 18 час. после инфицирования, в момент начала синтеза вирусной ДНК, часть такой новой клеточной ДНК становится гетерогенной при осаждении при щелочных значениях рН, что связано с разрывами во вновь синтезированной нити. Подобная гетерогенная форма образуется не в результате деградации нормальной молекулы ДНК, а вследствие постоянного синтеза клеточной ДНК на протяжении поздних стадий продуктивного цикла вируса (Branton et al., 1970). В случае непермиссивной системы — по крайней

мере в клетках крысиной эмбриональной ткани, инфицированных вирусом полиомы, — индуцируется синтез только нормальной клеточной ДНК (Sheinin, 1966a, b).

Описаны системы, в которых продуктивная инфекция клетки вирусом РУ или SV40 не ведет к индукции клеточной ДНК, а имеет место обратный феномен — подавление синтеза клеточной ДНК и митозов. Такими системами являются перевиваемая линия почек зеленых мартышек BSC-1, инфицированная SV40 (Gershon et al., 1966) и клетки мышинной эмбриональной ткани, инфицированные РУ в логарифмическую фазу роста (Sheinin, 1966a, b; Ирлиц, 1973); Брэнтон и Шейнин (Branton, Sheinin, 1968) представили данные, из которых следует, что основным фактором, детерминирующим феномен индукции клеточной ДНК при продуктивной литической инфекции, является множественность инфекции. В этой системе, при низкой или средней множественности инфекции РУ (1—100 БОЕ/кл), имеет место индукция клеточной ДНК, при более высокой (примерно 1000 БОЕ/кл) — ее подавление. В случае низкой множественности инфекции инфицируется не более 20% клеток, и лишь громадные дозы вируса обеспечивают 100%-ное инфицирование. В зависимости от множественности инфекции меняются сроки и последовательность синтеза различных компонентов РУ. Если в условиях низкой множественности инфекции (где имеет место индукция клеточной ДНК) синтез белков вирусного капсида начинается спустя 6 час. после начала синтеза ДНК вируса, то в условиях высокой множественности синтез вирусных белков начинается раньше и протекает практически одновременно с синтезом вирусной ДНК — спустя 12 час. после инфицирования.

Естественными явились попытки установить, насколько характерен феномен индукции синтеза клеточной ДНК для других онкогенных ДНК-содержащих вирусов.

Шимое и Ямашита (Shimojo, Yamashita, 1968) обнаружили индукцию клеточной ДНК в монослойных культурах эмбриональной ткани хомячков, инфицированных разными аденовирусами человека, типов 2, 3, 5, 7, 12 и 31. Чем больше была при этом множественность инфекции, тем выше была степень индукции ДНК. Высокоонкогенные типы аденовирусов (12 и 31) были более сильными индукторами, чем слабоонкогенные. Индукция ДНК происходила как в случае продуктивной инфекции, так и в пермиссивной системе.

Индукция синтеза ДНК имеет место и при инфекции клеток почек кролика вирусом кроличьей фибромы (Tompkins et al., 1969), лимфоцитов кур вирусом болезни Марека (Lee et al., 1972), при инфекции лейкоцитов человека вирусом Эпштейн-Барр (Gerber, Noyer, 1971) и при инфекции клеток мышей онкогенным штаммом аденовируса коров типа 3 (Tsukamoto, Sugino, 1972).

Вирус цитомегалии человека вызывает злокачественную трансформацию клеток золотистого хомячка *in vitro*. Было показано, что этот вирус вызывает индукцию клеточной ДНК как в пермиссивных (легкие эмбриона человека), так и в непермиссивных (хомячки) клетках (Joer et al., 1974).

Из изложенного очевидно, что ДНК-содержащие онкогенные вирусы вызывают синтез ДНК как в пермиссивных, так и в непермиссивных системах. Индукция для SV40 и PY описана не только для ядерной, но и для митохондриальной ДНК (Vesco, Basilico, 1971; Levine, 1971).

В пермиссивных клетках индукция синтеза клеточной ДНК PY или SV40 не сопровождается индукцией митоза (по-видимому, вследствие гибели клетки от ЦПД вируса), хотя изменения клеточной мембраны, как антигенные, так и структурные (связанные с агглютинабельностью клеток лектинами), характерные для трансформированных клеток, при этом четко выявляются (Dulbecco, 1973).

Иная ситуация имеет место в непермиссивных клетках: в этих системах происходит синтез ДНК, не отличающейся по своим свойствам от нормальной, но не происходит синтеза полного вируса или вирионных антигенов; в этих системах часть клеток претерпевает злокачественную трансформацию и синтез клеточной ДНК сопровождается индукцией митозов, иногда 50% инфицированных клеток (см. Winocour, 1969). Инфицированные клетки, в которых имеет место синтез клеточной ДНК, «дают» примерно в 3—8 раз больший «выход» трансформантов, чем такие же неиндуцированные клетки (Fox, Levine, 1971).

Инфекция эмбриональных клеток китайского хомячка или макрофагов PY мышей ведет при индукции синтеза ДНК к появлению уже в первой клеточной генерации большого количества полиплоидных ( $8n$  или выше) клеток. Нормальный режим митоза в таких клетках, следовательно, нарушен вирусом, что не отмечается при физиологических стимуляторах синтеза ДНК или митозов (например, при смене питательной среды, добавлении свежей сыворотки и т. д.). Первичная полиплоидия может являться тем возможным механизмом генетического разбаланса клетки, который возникает в процессе трансформации клетки ДНК-содержащим онкогенным вирусом и является необходимым фактором для прогрессии и адаптации. Если детерминация индукции синтеза клеточной ДНК в инфицированной клетке непосредственно геномом ДНК-содержащего онкогенного вируса не вызывает сомнений, то непосредственная локализация и определение гена (генов) вируса, ответственного за этот феномен, до последнего времени оставались неизвестными. Только успехи в изучении термочувствительных условных мутантов PY и SV40 позволили ответить на этот вопрос. Такими генами PY или SV40,

являются «ранние» гены. Точное «картирование» их — вопрос самого ближайшего времени.

Вейл и др. (Weil et al., 1974) в течение последних нескольких лет развивают представления, что такими генами могут быть гены, кодирующие Т-антиген, а сам Т-антиген является тем стартером, который запускает синтез ДНК или митоз (см. Шляпкевич, 1972). Подавление этого процесса интерфероном дает основание полагать, что он зависит также и от трансляции какой-то вирусспецифической РНК.

#### ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК IN VITRO

Изучение механизмов опухолевой трансформации клеток онкогенным вирусом *in vivo* на уровне целого организма крайне затруднительно, а во многих случаях — просто невозможно. Только после разработки современных методов культивирования клеток *in vitro* — главным образом метода однослойных культур — стал возможен тот громадный прогресс в изучении механизмов опухолевой трансформации и свойств опухолевых и нормальных клеток, свидетелями которого мы являемся.

Современный этап исследований в области вирусологии опухоли, механизма опухолевой трансформации клетки онкогенным вирусом начался только после того, как были получены экспериментальные модели вирусного канцерогенеза клеток *in vitro*. Эти модели позволили количественно, в контролируемых условиях изучать процесс опухолевой трансформации клетки вирусом, исследовать ряд последовательных стадий взаимодействия вируса и клетки — все то, что *in vivo* проследить или не удастся или крайне затруднительно.

Первые попытки воспроизвести злокачественную трансформацию нормальной клетки *in vitro* были предприняты еще пионерами самого метода культивирования клеток *in vitro* — Каррелем, Людфордом, Геом, Эрлом, А. Ф. Ларионовым, А. Д. Тимофеевским, М. А. Магатов и многими другими. Подробно все эти работы приведены и проанализированы в обзорах и монографиях (см. Тимофеевский, 1961; Шабат, 1947; Петров, 1947).

Современный этап изучения феномена опухолевой трансформации клетки начался в 1958 г. работами Рубина и Темина (Rubin, Temin, 1958), использовавшими в качестве предпосылки работу Менакера и Группэ (Manaker, Groupé, 1956) по обнаружению «очажков» измененных клеток в культуре эмбриональных фибробластов кур, инфицированных вирусом саркомы Рауса. С ДНК-содержащими вирусами первые работы по трансформации клеток *in vitro* провели Фогт и Дальбекко (Vogt, Dulbecco, 1960) на модели вируса полиомы.



В самом общем виде феномен трансформации клеток *in vitro* онкогенным вирусом состоит в появлении в монослойной культуре, инфицированной вирусом, «очажков» («фокусов») многослойного роста морфологически измененных клеток. Этот многослойный (трехмерный) характер роста является основным отличием «поведения» опухолевых, или трансформированных клеток от нормальных в однослойных культурах на стекле. Трансформация клеток *in vitro* в различных тканевых системах воспроизведена практически для всех известных онкогенных вирусов, исключая группу РНК-содержащих вирусов, вызывающих лимфолейкоз. Статистический анализ многих систем показал, что каждый «фокус» трансформации может индуцироваться одной вирусной частицей, и, следовательно, число «фокусов» трансформации, полученных в данной культуре определенной дозой вируса, позволяет определить трансформирующий титр вируса в «фокус-образующих единицах» (ФОЕ).

Изменение характера роста трансформированных клеток — наследственно закрепленное свойство, не связанное с размножением вируса в инфицированной клетке, сохраняющееся в течение сотен пассажей таких клеток *in vitro* и *in vivo*. Оно присуще и клонам, полученным от одной трансформированной клетки, что позволяет проводить количественный учет частоты трансформации клеток инфицированной популяции.

Ряд свойств отличает трансформированную вирусом клетку от родительской нормальной клетки:

1. Способность вызывать опухоли при введении чувствительному гомологичному животному.
2. Особенности роста клеток *in vitro*:
  - а) способность к росту в среде с низкой концентрацией сыворотки,
  - б) способность к росту в агаре или метоцеле,
  - в) способность к росту при высокой концентрации клеток,
  - г) способность к образованию клонов на монослое нормальных клеток,
  - д) дезориентированный, хаотичный тип роста.
3. Изменения поверхностных свойств клеток:
  - а) снижение контактного торможения движения,
  - б) снижение межклеточных контактов,
  - в) способность агглютинироваться растительными агглютинами (лектинами), в частности конканавалином А (КонА),
  - г) изменения структуры мембраны.
4. Биохимические изменения:
  - а) изменение и усиление активного транспорта сахаров,
  - б) увеличение протеолитической активности,
  - в) снижение концентрации циклического 3', 5'-аденозинмонофосфата,

- г) изменение состава гликопротеидов и гликолипопротеидов,
- д) снижение или исчезновение типоспецифического высокомолекулярного гликопротеида наружной мембраны,
- е) повышение анаэробного гликолиза.

5. Появление на поверхности вирусиндуцированных и вирусспецифических антигенов.

6. Изменение морфологии клетки.

Мы здесь только кратко перечислили основные особенности, отличающие трансформированную клетку от нормальной. Подчеркнем, что эти особенности трансформированной клетки — общие для РНК- и ДНК-содержащих онкогенных вирусов (за исключением, конечно, вирусспецифических антигенов). Не удастся с достаточной степенью достоверности различать особенности, присущие клеткам, трансформированным разными типами онкогенных вирусов, хотя определенные различия и имеют место.

Следует подчеркнуть, что все перечисленные признаки не являются абсолютными, уникальными для трансформированных клеток, а в той или иной мере присущи инфицированным клеткам, длительно пассируемым, или быстрорастущим, делящимся нормальным клеткам. Многие признаки трансформированной культуры могут быть «индуцированы» высокими концентрациями сыворотки в среде, обработкой клеток протеолитическими ферментами и т. д. Тем не менее в совокупности и морфологии клеток, и характер их роста, и способность к росту в агаре, особенно при анализе клонированной популяции в одинаковых с контролем условиях, являются надежными и удобными критериями различия нормальной и трансформированной клетки.

Ранее изменения характера роста трансформированных клеток было принято обозначать как утрату ими контактного торможения (КТ) деления или движения «соседними» нормальными клетками. Сейчас существование самого феномена КТ-деления подвергается сомнению. В ряде случаев мы используем этот термин лишь для удобства обозначения измененного характера роста трансформированных клеток. Характер изменения поведения трансформированных клеток *in vitro* и описанные выше многочисленные биохимические альтерации их свойств, несмотря на громадную литературу, еще во многом не ясны. Столь же мало понятна их кооперативность или дискретность проявления.

Мы не касаемся в главе всех этих феноменов и не приводим детального описания свойств и признаков трансформированных клеток.

Подробные данные обо всех этих вопросах читатель найдет в недавно опубликованных обзорах (Dulbecco, 1973; Tooze, 1973; Pollack, Hough, 1974; Sanford, 1974; Patterson, 1974; Paul et al., 1974).

Множественность признаков трансформированной клетки, отличающая ее от нормального прототипа, ставит вопрос о возможности кодирования всех их геномом вируса. Трудно себе представить, что геном РУ или SV40, содержащий максимум четыре гена, два из которых, по-видимому, ответственны только за синтез вирусных белков, может кодировать все признаки трансформированной клетки. Таким образом, речь должна идти или о существовании вирусного гена, обладающего плейотропным эффектом, или об активации вирусом «дремлющих» генов самой клетки.

В этой главе мы хотим представить материал только об одной стороне феномена трансформации — конкретной роли вирусного генома в этом процессе и определения или локализации той генетической информации вируса, которая непосредственно ответственна за трансформацию нормальной клетки в опухолевую.

#### *ДНК-содержащие онкогенные вирусы*

В процессе клеточной трансформации реализуется только часть функций вирусного генома. Наиболее очевидно это в случае ДНК-содержащих вирусов. Полный цикл созревания вируса сопровождается гибелью клетки, и, следовательно, трансформация всегда должна являться в этих системах abortивной инфекцией, при которой «поздние» функции вируса не реализуются. Такими «поздними» функциями вирусного гена для ДНК-содержащих онкогенных вирусов являются синтез вирусной ДНК и вирионных антигенов и созревание вирусных частиц. Все это дает основание предположить, что только часть вирусного генома ответственна за трансформацию клетки. Прямые экспериментальные факты подтверждают это. Бенджамин (Benjamin, 1965) и Базилико и Майорка (Basilico, DiMauro, 1965), сравнивая темп инактивации инфекционной и трансформирующей способности при облучении X-лучами, УФ или при обработке азотистой кислотой, показали, что количество генетической информации, необходимое для трансформации, составляет около 50% генетической матрицы, требуемой для вегетативного роста вируса; по данным Лятарже и др. (Latarjet et al., 1967), для трансформации клеток РУ требуется лишь около  $\frac{1}{5}$  части вирусного генома. Позднее Мейер и др. (Meyer et al., 1969) на той же модели показали, что для индукции Т-антигена требуется примерно половина вирусного генома, а для индукции вирусспецифического трансплантационного поверхностного антигена — только  $\frac{1}{6}$  его часть. Размер генетической мишени вируса SV40, ответственной за индукцию синтеза клеточной ДНК, тимидинкиназы, Т-антигена и трансплантационного антигена, также значительно меньше части генома вируса, необходимой для репродукции. В случае Т-анти-

гена она составляет  $1/3-1/4$  часть его (Carp et al., 1966; Carp, Gilden, 1965).

Во многих клеточных системах в опытах по инактивации размеры трансформирующей мишени для вируса SV40 и мишени, ответственной за синтез Т-антигена, совпадали (см. Kit et al., 1969).

Дефенди и Енсен (Defendi, Jensen, 1967), облучая УФ или X-лучами вирусы SV40 и РУ, обнаружили, что трансформирующая активность обоих вирусов не только была более резистентна к инаktivации, чем их инфекционность, но даже повышалась как в относительных, так и в абсолютных цифрах. Сходные данные были получены Альтштейном и др. (Altstein et al., 1967a, b) с вирусом SV40, обработанным гидроксиламином.

Дефенди и Енсен в опытах с гибридом аденовируса типа 7 и вируса SV40 показали, что необлученный вирус вообще в некоторых сериях не вызывал опухолей у хомячков, а онкогенные потенции выявлялись лишь у облученных УФ частиц, причем дозами, снижающими инфекционность на  $4 \log$  (!). Опухоли, вызванные облученным гибридом или вирусом SV40, инаktivированным гидроксиламином, синтезировали Т-антиген. Во всех случаях средний латентный период появления опухолей от введения облученного вируса был короче, чем от необлученного. Таким образом, повреждение части генома онкогенного ДНК-содержащего вируса, предотвращающее вегетативный рост, не только сохраняет, но даже усиливает его онкогенные или трансформирующие потенции.

Трансформирующая способность вируса SV40 увеличивается после слабого УФ облучения (500—10 000 эрг/мин). Эта способность вируса высокорезистентна к сильному УФ облучению (10 000—60 000 эрг/мин) по сравнению со свойством инфекционности (на  $4-5 \log$ ) (Seemaeyer et al., 1973).

Основной механизм повреждающего действия УФ сводится к образованию димеров тимина в молекуле ДНК, что ведет к прекращению транскрипции с таких участков и, следовательно, к подавлению их функциональной активности в клетке. Характерно, что клетки, трансформированные облученным вирусом, имели тот же «трансформированный» фенотип и содержали Т-антиген, как и клетки, трансформированные полным вирусом SV40.

Опыты с инаktivацией вируса SV40 УФ показали, что трансформирующее свойство вируса (и способность синтезировать Т-антиген) — наиболее резистентная функция вирусного генома. При этом не было обнаружено, что такая резистентность обусловлена множественной реактивацией. Однако механизм резистентности трансформирующей способности вируса SV40 к УФ оказался более сложным, чем просто «малый размер трансформирую-



щей мишени». Так, Сеемайер и Дефенди (Seemayer, Defendi, 1974) показали, что кофеин (подавляющий механизм репарации клеточной ДНК) подавлял трансформирующую способность облученного УФ вируса SV40. Отсюда вытекает, что клеточный репаративный механизм, по-видимому, играет роль в процессе трансформации. Данные о большей резистентности к инаktivации облучением трансформирующей способности по сравнению с инфекционностью были получены и для аденовируса человека типа 12 и аденовируса обезьян (Finkelstein, McAllister, 1969; Casto, 1968).

В ряде систем, например, для вирусов HSV-2 и HSV-1 достоверную трансформацию *in vitro* удастся получить в пермиссивных системах только облученным вирусом (Duff, Rapp, 1971a, b, 1973).

Аналогичные данные о злокачественной трансформации клеток облученным УФ вирусом были получены и для вируса цитомегалии человека (Albrecht, Rapp, 1973). В непермиссивной системе трансформацию можно получить и необлученным вирусом герпеса типа 2 (Dagai, Munk, 1973).

Фотодинамическая инаktivация инфекционности вируса SV40 и герпеса типов 1 и 2 не подавляла их способность трансформировать клетки золотистого хомячка *in vitro* (Rapp, 1973).

Дефектные (неполные) частицы вируса SV40 образуются и в процессе нормального синтеза вируса, причем количество их пропорционально увеличивается при пассажах неразведенным материалом. Такие частицы не образуют инфекционных «бляшек», содержат только 85% нормального количества ДНК и индуцируют синтез Т-антигена (Sauer et al., 1967; Altstein et al., 1966, 1967a, b). Ишида и Ватанабе (Uchida, Watanabe, 1968) показали, что такие частицы высокоонкогенны для хомячков и трансформировали клетки *in vitro*.

Из различного типа дефектных частиц SV40 только вирионы, сохранившие способность к индукции Т-антигена, вызывали опухоли у хомячков, *in vitro* трансформировали клетки 3Т3 и индуцировали в зараженных клетках синтез клеточной ДНК (Uchida, Watanabe, 1968, 1969; Kato et al., 1974).

При сравнении низкоонкогенных мутантов аденовируса типа 12 с диким штаммом, характеризующимся высокой трансформирующей активностью, было показано, что популяции последнего содержат значительно больше дефектных частиц (Ezol, Mak, 1974).

Все эти опыты ясно показывают, что генетическая информация ДНК-содержащего вируса, необходимая для опухолевой трансформации клетки, составляет лишь часть полного генома вируса. Однако опыты по инаktivации лишь косвенно указывают на размер «трансформирующей» мишени вируса и ничего не могут сказать о месте локализации ее в геноме вируса.

Прямое определение размеров и локализации трансформирующего «района» в геноме ДНК-содержащего онкогенного вируса проведено в настоящее время на модели аденовирусов человека.

Аденовирус типа 5 относится к группе С (см. главу 2) «неонкогенных» аденовирусов. Вирусы этой группы не индуцируют опухоли при введении их новорожденным животным, однако *in vitro* они трансформируют непермиссивные клетки, которые при введении тимэктомированным животным образуют опухоли (см. Green, 1970). Для определения трансформирующего участка генома аденовируса типа 5 Грэхэм и др. (Graham et al., 1974) фрагментировали молекулу вирусной ДНК на отрезки различного молекулярного веса. Фрагменты молекулы ДНК с коэффициентом седиментации 22S (молекулярный вес  $8 \cdot 10^6$  дальтон), полностью утратившие инфекционность, обладали трансформирующей активностью.

Более того, даже меньшие участки вирусной ДНК ( $3 \cdot 10^6$  дальтон) сохраняли трансформирующую активность той же эффективности, что и нативная молекула ДНК (около  $20 \cdot 10^6$  дальтон). Лишь фрагментация молекулы нуклеиновой кислоты на отрезки меньшие  $2 \cdot 10^6$  дальтон лишала их трансформирующей активности (Graham et al., 1974).

Все линии клеток крыс, трансформированных фрагментами ДНК аденовируса типа 5, синтезировали Т-антиген. Сочетая фрагментацию вирусной ДНК с рестриктазным анализом фрагментов, Грэхэм и др. (Graham et al., 1974) показали, что участки вирусной ДНК, составляющие менее 5% нативной молекулы и локализованные между 1 и 6% от левого конца вирусного генома, способны индуцировать и сохранять статус трансформации непермиссивной клетки. Такое количество вирусной ДНК может кодировать не более 1—2 белков среднего размера, и, следовательно, не более 2 генов вируса вовлечены в процесс трансформации клеток крыс аденовирусом типа 5.

Эти результаты совпадают с данными о том, что примерно 4—10% вирусного генома транскрибируется в клетках крыс, трансформированных аденовирусом типа 2 (см. главу 6), а также с данными Галлимора (Gallimore), на которые ссылаются авторы, что левый конец ДНК аденовируса типа 2 от 0 до 14% всегда обнаруживался в трансформированных клетках крыс. Надо подчеркнуть, что цитируемая работа Грэхэм и др. не является первой, в которой показан трансформирующий онкогенный эффект фрагментов цельной молекулы вирусной ДНК. Еще в 1971 г. Мэйн и др. (Maune et al., 1971) показали, что фрагменты ДНК аденовируса обезьян SA7, размерами около  $11 \cdot 10^6$  дальтон (примерно половина нативной молекулы ДНК), были онкогенны. Недавно эта же группа авторов, используя рестриктазный анализ

ДНК SA7, показали, что только «плотные» (с высоким содержанием Г+Ц), фрагменты с молекулярным весом не ниже  $5 \cdot 10^6$  дальтон были онкогенны (Burnett et al., 1975).

#### *РНК-содержащие онкогенные вирусы*

Опыты с облучением для определения количества генетической информации, необходимой для трансформации клетки в случае РНК-содержащих вирусов, не дали столь четких результатов, как это было получено с ДНК-содержащими вирусами.

Работая с недефектным штаммом RSV (Шмидт-Руппин), Гольде и Латарже (Golde, Latarjet, 1966) показали, что скорость инактивации репродуцирующей способности вируса при облучении  $\gamma$ -лучами выше, чем скорость инактивации его «фокусобразующей» способности. Отсюда следует, что размер генетической мишени, кодирующей его трансформирующую способность, меньше «репродуцирующей» мишени. Клетки, трансформированные облученным вирусом, образовывали «безвирусные» опухоли на хориоаллантоисной мембране куриных эмбрионов. Суперинфекция таких клеток вирусами RAV не активировала в них продукции инфекционного вируса Рауса. Аналогичные данные получили Ханафуза и др. (Hanafusa et al., 1970a) для RSV(0). После облучения УФ вирус трансформировал клетки, в которых затем не удавалось обнаружить репродукции как инфекционного вируса, так и образования неинфекционных частиц С-типа. Суперинфекция таких клеток вирусами-«помощниками» также не приводила к активации полного вируса Рауса. Фриис (Friis, 1971) сравнивал скорость инактивации УФ дефектных и недефектных штаммов RSV и показал, что способность образовывать «фокусы» у дефектного штамма более резистентна, чем у недефектного (B-77). Эти различия в кинетике инактивации двух штаммов RSV не зависели от типа клетки хозяина. Более того, и другой недефектный штамм RSV — штамм Прага по своей чувствительности к УФ был идентичен B-77. Повторные опыты этого автора подтвердили то, что дефектные штаммы более резистентны к УФ, чем недефектные. Возможно, количество генетического материала вируса, размер «мишени», у недефектного штамма больше, чем у дефектного.

Тойошима и др. (Toyoshima et al., 1970) также изучали этот вопрос на модели вируса RSV, штамм B-77. Они показали, что в результате облучения в популяции образуются два типа «дефектных» вирусных частиц. Один тип частиц трансформировал клетки, не образуя инфекционного потомства. При этом в таких клетках не наблюдалось образования и неинфекционных частиц С-типа. Из таких клеток суперинфекцией вирусом-«помощником» не удавалось активировать инфекционный RSV. Удивительным

было и другое — трансформированные облученным вирусом клетки не могли сохранять статус трансформации при пассировании. В пассажах они «нормализовались». Количество генетического материала облученного В-77, необходимое для трансформации клеток, было одинаково для клеток генетически различных линий кур, гусей и уток. Не удалось установить, с чем связана утрата статуса трансформации клетками, инфицированными облученным В-77. Этот «дефект» также не мог быть восстановлен суперинфекцией клеток различными вирусами-«помощниками». Другой тип дефектных частиц в популяции облученного недефектного вируса RSV мог репродуцироваться в клетках, обладая свойствами вируса-«помощника», но утратил способность трансформировать клетки. Антигенно эти частицы были идентичны исходному штамму В-77. Следует указать, что подобный тип радиационных мутантов, утративших способность трансформировать клетку, но сохранивших способность репродуцироваться, еще ранее наблюдала Гольде (Golde, 1970) при облучении клональной популяции RSV (штамм Шмидт-Руппин). В том же году Граф и Бауер (Graf, Bauer, 1970) опубликовали подробную работу, из результатов которой следовало, что размеры трансформирующей матрицы в геноме RSV совпадают с размерами «репродуцирующей».

Спустя год эти же авторы (см. Graf, Bauer, 1971) опубликовали новую работу, в которой пытались выяснить причины расхождения своих данных с данными других авторов. Используя разные недефектные штаммы RSV (штамм Шмидт-Руппина и штамм В-77) и различные мутагены (гидроксиламин,  $\gamma$ -лучи, X-лучи и УФ), авторы не смогли получить вирусные частицы, обладающие способностью трансформировать клетку, но не способные давать инфекционное потомство. Мутанты же, способные к размножению, но не способные трансформировать клетку, удалось получить от всех использованных штаммов RSV. Эти же частицы вызывали интерференцию с исходным родительским штаммом. На основании своих опытов авторы предположили, что для образования пролиферирующего «фокуса» клетками, трансформированными RSV, необходим весь геном вируса. Однако только часть генома необходима для образования нетрансформирующей клетку инфекционных вирусных частиц. Лишь в случае штамма В-77, обработанного гидроксиламином, эти авторы получили данные, аналогичные результатам Тойошима и др. (Toyoshima et al., 1970): были выделены мутанты вируса В-77, которые вызывали регрессирующие или «нормализующиеся» после нескольких пассажей «фокусы» трансформации. Урожай трансформирующих частиц из таких «фокусов» был крайне низким.

Обнаружение радиационных мутантов RSV, антигенно идентичных исходному вирусу, способных размножаться и вызывать



интерференцию, но утративших свойство трансформировать клетку, представляет большой интерес. По существу здесь имеет место мутация (или делеция) саркомогенного вируса в лейкозный вирус-«помощник». Подобный мутант был получен Мартином (Martin, 1970) при обработке RSV (Ш-Р) нитрозогуанидином. Такой вирус индуцировал образование «фокусов» трансформации, которые при культивировании «нормализовались». Трансформирующий вирус в таких «фокусах» обнаружить не удалось, хотя электронномикроскопически частицы С-типа были обнаружены в трансформированных клетках.

Было проведено исследование с целью обнаружить различия в скорости инактивации УФ способности MSV трансформировать клетки и MuLV — размножаться в них (Kelloff et al., 1970c). Полученные данные показали, что оба свойства этих двух вирусов инактивируются по типу одноударной кривой с одинаковым наклоном. Отсюда следует, что размер мишени для репликации вируса и трансформации клетки у обоих вирусов одинаков, однако отражает ли это истинное сходство генетических матриц, сказать трудно. Впоследствии Номура и др. (Nomura et al., 1972b) показали, что для феномена «спасения» MSV необходим весь интактный геном лейкозного вируса-«помощника». В то же время «фокус-образующая» активность вируса MSV была менее чувствительна к УФ, чем «спасающая» функция MuLV (примерно в 1,7 раза). Способность же активировать и свойство размножаться у MuLV были одинаково чувствительны к УФ.

Все эти опыты с РНК-содержащими вирусами, несмотря на очевидные сложности в трактовке полученных данных, показывали, что в геноме онкорнавируса можно разделить трансформирующую и реплицирующую мишени. Однако сложность строения генома онкорнавирусов не позволила в такого рода опытах решить точно, каковы размер и количество генетического материала, необходимого для трансформации. Более того, данные, полученные и с ДНК-содержащими вирусами, дали возможность говорить лишь о сравнительно меньшей величине трансформирующего генома вируса по сравнению с геномом, необходимым для репликации вируса. Однако из подобного рода экспериментов нельзя было получить данные о генетической карте онкогенного вируса, о локализации, количестве и «порядке» генов, ответственных за трансформацию. Иначе говоря, полностью отсутствовали прямые данные о конкретном определении генов (гена), ответственных за трансформацию клетки. Предпосылкой и основой для такого рода работ явилось получение, выделение и изучение условных (термочувствительных) мутантов онкогенных вирусов.

Термочувствительные (ts) мутанты фагов и вирусов животных известны давно. Природа этой «условной» мутации сводится к следующему: вторичная, третичная и четвертичная структуры,

образуемые полипептидной цепью с определенной первичной структурой, зависят от внешних условий, особенно от температуры. Функционально активная вторичная и т. д. структура каждого белка возникает в довольно строго ограниченном и «физиологическом» интервале температур, а за пределами этого интервала белок переходит в нефункциональную денатурированную форму. Первичная структура белков, кодируемая генами дикого типа, такова, что их функционально активные структуры высших порядков образуются в интервале температур от 25 до 42°. Изменение последовательности нуклеотидов в гене, несущем *ts*-мутацию, ведет к такому изменению первичной структуры полипептида, при котором мутантный белок, хотя и сохраняет способность образовывать функционально активные структуры высшего порядка при 32° (пермиссивная температура), при запрещающей (непермиссивной) температуре 39—42°, переходит в нефункциональную форму (см. Гендон, 1967).

*Термочувствительные (ts) мутанты  
ДНК-содержащих вирусов*

При помощи теста физиологической комплементации *ts*-мутанты вируса полиомы и SV40 были разделены на четыре класса. Мутанты внутри одного класса не комплементируют один с другим; комплементация имеет место лишь у мутантов разных классов.

Все известные классы *ts*-мутантов РУ и SV40 можно в свою очередь разделить на «ранние» и «поздние». «Поздние» *ts*-мутанты дефектны по «поздним» функциям вирусного генома (синтез вирусной ДНК, вирионные антигены) при непермиссивной температуре. Для «ранних» мутантов при непермиссивной температуре характерен блок и «ранних» и «поздних» функций вирусного генома. Естественно, что при анализе генов, ответственных за трансформацию клетки, нас больше интересуют «ранние» классы мутантов.

Получение *ts*-А-мутанта вируса полиомы (Fried, 1965), дефектного по синтезу вирусной ДНК при непермиссивной температуре, позволило выявить ген или гены, ответственные за стабильную интеграцию вируса полиомы в геном клетки; *ts*-А-мутант РУ не вызывает стабильной трансформации при непермиссивной температуре. При пермиссивной температуре он трансформирует клетки, фенотип которых сохраняется и при последующем переносе их в температуру 39°. При первичной инфекции клетки *ts*-А-мутантом при 39° имеет место транзиторная или abortивная (в зависимости от клеточной системы) трансформация (Stoker, Dulbecco, 1969). Экхарт (Eckhart, 1971) показал, что мутантный ген *ts*-А вируса не связан с индукцией вирусным геномом синтеза клеточной ДНК, но необходим для инициации

синтеза вирусной ДНК. Данные, представленные в этой работе, а также последующие исследования (см. Francke, Eckhart, 1973) с переносом инфицированных клеток из перmissive температуры в неpermissive показывают, что продукт ts-A вируса полиомы необходим для инициации каждого нового цикла репликации вирусной ДНК. Интересно, что синтез Т-антигена в клетках, инфицированных этим мутантом, был также термочувствительным.

Фогт (Vogt, 1970) выделила несколько линий 3Т3 BALB клеток, трансформированных ts-A РУ при неpermissive температуре. Такие клетки удавалось пассировать в течение нескольких пассажей при 39°, но перенос их в температуру 31° вел к индукции синтеза полного вируса и гибели клеток.

Аналогичные ts-мутанты были описаны и для вируса SV40 (ts-A7, ts-A28, ts-A30) (см. Tegtmeier, 1972). Используя перенос инфицированных клеток из перmissive температуры в неpermissive и обратно, Тегтмаер показал, что мутантный ген требуется только для инициации (но не для завершения) каждого нового цикла синтеза вирусной ДНК SV40, и для стабильной трансформации клеток 3Т3. Отсюда следует, что мутантный ген с полным основанием может считаться репликоном вируса SV40. Так, Натанс и Дэнна (Nathans, Danna, 1972) показали, что вирус SV40 имеет определенные генетические детерминанты (гены) синтеза вирусной ДНК. Очевидно, что у ts-A-мутантов мутация произошла в каком-то из генов этой системы.

Изучая синтез вирусной РНК в клетках зеленых мартышек, инфицированных ts-A30 (permissive система), Ковэн и др. (Cowan et al., 1973) показали, что экспрессия гена А прямо или опосредованно требуется для инициации транскрипции «поздней», но не «ранней» вирусной РНК и что продолжение экспрессии гена А и продолжение синтеза вирусной ДНК не требуется для сохранения транскрипции «поздних» генов вируса после начала синтеза вирусной ДНК. При этом было показано, что при инфекции в неpermissive температуре идет синтез только «ранней» вирусной РНК.

При обобщении материала по ts-A типам мутантов РУ и SV40 функции мутантного гена можно представить следующим образом.

Неpermissive температура блокирует в неpermissивных клетках, инфицированных ts-A-мутантами, только инициацию трансформации, выявляемую по способности клеток расти в агаре. Перенос трансформированных ts-A вирусами клеток в неpermissive температуру не ведет к реверсии статуса трансформации. В перmissive клетках неpermissive температура блокирует индукцию синтеза Т-антигена и вирусной ДНК. Блок синтеза вирусной ДНК происходит на уровне инициации каждого раунда синтеза ДНК. Индукция синтеза клеточной ДНК

ts-A-мутантами РУ и SV40 не блокируется непермиссивной температурой.

Однако последующее изучение ts-A-мутантов РУ и SV40 не подтвердило эту схему. Использование более адекватных моделей для изучения инфекционного и трансформирующего действия ts-A-мутантов показало, что функция мутантного гена постоянно требуется не только для инициации, но и для сохранения по крайней мере части свойств трансформированной клетки — способности роста в среде с низкой концентрацией сыворотки, росту в агаре или для образовывания колоний на монослое нормальных клеток (Kimura, Itagaki, 1975; Kimura, 1975). Более того, такие кардинальные свойства ДНК-содержащих онкогенных вирусов, как синтез Т-антигена и индукция синтеза клеточной ДНК, для SV40 и РУ кодируются, по-видимому, также ts-A геном (Chou, Martin, 1975). Паулин и Кузин (Paulin, Cuzin, 1975) показали, что Т-антиген, синтезируемый в клетках, трансформированных ts-A-мутантом РУ, значительно более термоллабилен, чем Т-антиген, индуцируемый диким типом вируса. Возможно, что ts-A цистрон РУ и SV40 и является трансформирующим геном (онкогеном), ответственным за малигнизацию клетки. Механизм действия этого гена еще не ясен, однако не исключено, что Т-антиген — единственный «продукт» этого гена и именно тот фактор, через который А цистрон вирусного генома реализует свое трансформирующее действие.

В настоящее время разработаны методы, позволяющие непосредственно картировать мутантные гены РУ и SV40 на молекуле ДНК вируса (см. Lai, Nathans, 1974). Мутантная функция ts-A типа мутантов SV40 картирована в смежных сегментах Hin-H (ts-A30) и Hin-I (ts-A28), которые являются частью «раннего» района генома SV40. Мутации типа ts-3 (см. ниже) картированы в сегменте Hin-E (см. главу 5, рис. 1).

«Ранние» ts-мутанты РУ и SV40 другого класса — ts-3 (ts\*-101) только условно могут быть названы ранними. Необычность этого типа мутантов и сложность анализа их функций не позволяют в настоящее время считать приведенные ниже данные окончательными.

Клетки, трансформированные ts-3 мутантом РУ, при непермиссивной температуре перестают агглютинироваться Кон А и претерпевают изменения морфологии и ростовых свойств, характерные для нормальных клеток (Dulbecco, Eckhart, 1970; Eckhart et al., 1971). При непермиссивной температуре ts-3 РУ не способен индуцировать синтез клеточной ДНК, изменения, связанные с агглютинабельностью Кон А, или трансформировать клетки. Надо подчеркнуть, что функция этого гена в значительной степени зависит от чувствительности клеток-мишеней к регуляции роста КТ; ts-3 мутантный ген в КТ-клетках ответствен за «тран-



сформированный» фенотип. Однако такое свойство, как способность к росту в агаре, не зависело от температуры у клеток, трансформированных *ts-3* мутантом.

Инфекция перmissivevных клеток *ts-3* РУ при неперmissivevной температуре блокируется до начала синтеза вирусной ДНК. Степень блокирования различна в разных типах перmissivevных клеток. Это говорит о том, что клеточные факторы играют роль в экспрессии мутантной функции вируса. Мутантный дефект вируса мог быть «реставрирован» инкубацией инфицированных клеток при перmissivevной температуре, при подавлении синтеза ДНК оксимочевинной. Очевидно, *ts-3* функция РУ не требуется постоянно (в отличие от *ts-A* функции) для синтеза вирусной ДНК. Рост *ts-3* вируса не зависел от температуры при инфекции клеток ДНК *ts-3* (см. Eckhart, Dulbecco, 1974).

У вируса SV40 описан сходный с *ts-3* мутантом вируса полиомы «ранний» мутант *ts-101* (Robb, Martin, 1972), при неперmissivevной температуре способный к адсорбции, проникновению и «раздеванию», но у которого при этом блокированы такие функции, как индукция синтеза клеточной ДНК, Т-антигена, U-антигена и вирусной ДНК. Однако термочувствительным продуктом мутантного гена оказался вирионный белок (Robb et al., 1972). При этом при неперmissivevной температуре была блокирована и способность вирусной ДНК к интеграции и синтезу и-РНК. В неперmissivevных клетках китайского хомячка при неперmissivevной температуре этот мутант индуцировал синтез Т-антигена и происходила интеграция геномов, однако индукция синтеза клеточной ДНК была в этих условиях подавлена (Hirai et al., 1974). Из этих данных следует, что, возможно, часть ранних функций SV40 регулируется или опосредуется клеткой. Ранее Робб и др. (Robb et al., 1972) показали, что в клетках линий 3Т3×BALB, (где имеет место abortивная инфекция) даже при перmissivevной температуре синтез Т-антигена блокирован. Инфекция перmissivevных клеток и клеток BALB ДНК *ts\*-101* вела к индукции Т-антигена при неперmissivevной температуре. В перmissivevной системе (клетки CV-1) вирионный белок мутанта *ts\*-101* начинает, по-видимому, функционировать после пенетрации вирусной ДНК в ядро, но до интеграции ДНК (Hirai et al., 1974). Выдвинуто предположение, что в перmissivevной системе вирионный белок *ts\*-101*, взаимодействуя с вирусной ДНК, играет роль в интеграции и транскрипции. По-видимому, синтез клеточной ДНК не является при этом необходимым условием для интеграции. Отсюда следует также, что интеграция предшествует индукции синтеза клеточной ДНК (см. Hirai et al., 1971, 1974). Мутантная функция *ts*-мутантов этой группы реализуется до индукции синтеза вирусной ДНК, однако в отличие от мутантов типа *ts-A*, предварительная инкубация инфицированных клеток при перmissivevной

сивной температуре в течение 10—20 час. подавляет блок синтеза вирусной ДНК при последующем переносе таких клеток в непермиссивную температуру (Chou et al., 1974).

Комплементация не обнаружена для ts-мутантов этого типа как РУ, так и SV40. Это лишний раз подтверждает необычность «локализации» мутантной функции и дает дополнительные основания предполагать наличие мутации именно в вирионном белке. Однако это не единственное объяснение ts-3 (ts\*-101) мутации. Потеря способности к комплементации может быть связана с *цис*-действием продукта вирусного гена, синтезируемого в течение инфекции. *цис*-Действующие белки, вовлеченные в процесс репликации ДНК, описаны для нескольких фагов (см. Eckhart, Dulbecco, 1974).

Заканчивая раздел о ts-мутантах вирусов группы Рапова, мы хотели бы еще раз подчеркнуть, что многие из изложенных выше фактов еще нуждаются в подтверждении или их интерпретация может быть изменена. Это в первую очередь касается мутантов типа ts-3 (ts\*-101). Возможно, что мутировавший ген этих штаммов вирусов полиомы и SV40 действительно не имеет прямого отношения к индукции и поддержанию трансформированного фенотипа инфицированных клеток. В связи с этим для понимания механизма трансформации клетки все большее внимание привлекают мутанты типа ts-A. В докладах последнего Cold Spring Harbor Symposium (1974) приведены факты, которые подтверждают предположение о том, что ts-A ген вирусов Рапова является основным и быть может единственным геном, ответственным за трансформацию клетки. С функцией этого гена связывают сейчас такие свойства вирусной частицы как индукция синтеза клеточной ДНК, индукция синтеза Т-антигена, способность к росту в агаре, поддержание трансформированного фенотипа, индукция синтеза вирусной ДНК. «Генетическая информация» этого гена представляет собой «раннюю» 19S РНК, а единственный идентифицированный продукт ее — Т-антиген. Возможно ли связать с Т-антигеном столь разнообразные явления, выявляемые в процессе трансформации клетки, и действительно ли они тесно связаны между собой и взаимообусловлены, покажут эксперименты ближайшего будущего.

#### *Термочувствительные мутанты РНК-содержащих вирусов*

Впервые данные о роли конкретных генов РНК-содержащих вирусов в трансформации были получены с мутантами RSV, изолированными практически одновременно Тойошима и Фогтом (Toyoshima, Vogt, 1969), Фрисом (Friis, 1971) и Мартином (Martin, 1970).

Мартину удалось получить термочувствительный мутант T-1 RSV (Ш-Р), который при 41° (непермиссивная температура) репродуцировался также как дикий штамм, но при этой температуре терял способность трансформировать клетку. Более того, мутант T-1 при температуре 41° вел себя как лейкозный вирус-«помощник» и при инфекции клеток ткани кур интерферировал с «фокус-образующими» вирусами группы А. При пермиссивной температуре T-1 трансформировал клетки, причем примерно с той же эффективностью, что и дикий штамм. Однако стоило такие T-1 трансформированные клетки перенести в непермиссивную температуру, как в среднем за 4 часа трансформированные клетки ревертировались к норме. Следовательно, мутантная функция вируса постоянно требовалась для сохранения клетками статуса трансформации. Если клетки, зараженные T-1 мутантом, культивировать в течение нескольких дней при непермиссивной температуре, а затем перенести в пермиссивную температуру, что статус трансформации быстро проявлялся (правда, несколько медленнее, чем исчезал). Клетки, инфицированные мутантным вирусом, при непермиссивной температуре утрачивали способность к росту в агаре.

Термочувствительные мутанты RSV были описаны также Тойошима и Фогтом (Toyoshima, Vogt, 1969) и Фрисом (Friis, 1974). Авторы выделили два термочувствительных мутанта — ts-75 и ts-149 — из «стока» вируса Рауса (штамм В-77). В отличие от мутанта T-1 мутанты ts-75 и ts-149 при непермиссивной температуре не только не трансформировали клетки, но и теряли способность к репродукции; по всем другим свойствам — спектру чувствительных линий, типоспецифической антигенности, скорости инактивации при непермиссивной температуре — оба мутанта не отличались от дикого штамма. Как и у мутанта T-1, перенос трансформированных обоими мутантами клеток в непермиссивную температуру приводил к утрате ими статуса трансформации. Эти свойства клетки, трансформированные мутантами, сохраняли и *in vivo*. Температурочувствительный этап взаимодействия ts-75 и ts-149 с клеткой был различным: для ts-149 ранний перенос в непермиссивную температуру предотвращал индукцию синтеза gs-антигена, ts-75 при таких условиях индуцировал в клетке и синтез gs-антигена и вирусной РНК. Интересно, что способность к росту в агаре у инфицированных ts-149 и ts-75 клеток была одинаковой как при пермиссивной, так и при непермиссивной температуре. Аналогичные ts-мутанты RSV были получены и из «стока» штамма Шмидт-Руппин. В непермиссивной температуре трансформированные клетки утрачивали все фенотипические признаки трансформации, но вегетативный рост самого вируса не был термочувствителен. Ретрансформация при переносе в пермиссивную температуру происходила за 5—6 час.

(около 50% клеток). Обратный процесс (реверсия) был более медленным и, по-видимому, требовал клеточного деления. Синтез ДНК ни для восстановления статуса трансформации, ни для фенотипической реверсии клеток к норме при переносах из непермиссивной температуры в пермиссивную и обратно не требовался. Однако оба эти процесса подавляются ингибиторами синтеза белка (Friis et al., 1974; Kawai, Hanafusa, 1972).

Многочисленные факты, полученные в работах с *ts*-мутантами вируса Рауса, позволяют к настоящему времени классифицировать их и построить биологическую карту генов вируса Рауса. Они включают термочувствительные условные мутанты, не условные мутанты: типа *td* (трансформация дефектные), типа *rd* (репликация дефектные), типа *cd* (координационно дефектные), утратившие способность как к размножению, так и к трансформации, типа *fr* (определяющие морфологию трансформированных клеток) (см. Vogt et al., 1974). *Ts*-мутанты также можно разделить на три категории: мутанты *ts-T*, у которых *ts*-мутантная функция связана только со свойством трансформации клеток. Часть таких мутантов была описана выше. При непермиссивной температуре такие мутанты утрачивают способность трансформировать клетки, но способность к репликации нетрансформирующих вирусных частиц у них сохраняется (Toyoshima, Vogt, 1969; Martin, 1970; Kawai, Hanafusa, 1972; Biquard, Vigier, 1972; Wyke, Linial, 1973). Клетки, инфицированные при непермиссивной температуре *ts*-мутантом, описанным Каваи и Ханафуза (Kawai, Hanafusa, 1974) (*ts-68*), при реинфекции их ALV подгрупп В и D (но не А, С и Е) претерпевают при 41° характерный цитопатогенный эффект, который может быть использован для количественного титрования этих вирусов методом «негативных бляшек» (Kawai, Hanafusa, 1972). Мутанты *ts-T*-типа Т-1 и *ts-68* были получены и Каваи и др. (Kawai et al., 1972). Для них (Т-10, *ts-19*) была характерна реверсия трансформации при непермиссивной и быстрая реставрация трансформированного фенотипа при переносе в пермиссивную температуру. Этот процесс не подавлялся цитозинарабинозидом или актиномицином Д, но ингибировался циклогексимидом или пурамицином. Отсюда очевидно, что *ts*-продукт мутантного гена может действовать на уровне трансляции или же взаимодействовать с какими-то предшествующими клеточными белковыми компонентами, которые и связаны с экспрессией трансформированного статуса. Рекомбинация *ts-T*-мутантов с вирусами RAV не приводила к комплементации *ts*-функции. Одновременная инфекция клетки двумя *ts-T*-мутантами (*ts-19* и *ts-69*) или одним и тем же мутантом, но разного псевдотипа не увеличивала число трансформированных клеток. Однако одновременное заражение клеток при непермиссивной температуре *ts-T*-мутантами Т-10 и *ts-68* или Т-10 и *ts-19* вело к ревер-



кому увеличению числа трансформированных клеток. Не исключено, что по крайней мере два разных белка (продукта) или две субъединицы одного белка вовлечены в процесс трансформации клетки. Этот же вывод можно сделать и из работы Вайке и Линиала (Wyke, Linial, 1973): среди T-типов ts-мутантов RSV было найдено четыре группы комплементации, что говорит о вовлечении в процесс трансформации клетки RSV нескольких генов.

Ts-г-мутанты имеют в своем геноме повреждение, затрагивающее только функцию репликации вируса Рауса. Такой мутант (ts-672) описан недавно Фрисом и Хантером (Friss, Hanter, 1973). Этот мутант RSV (штамм Прага) при 41° утрачивал способность размножаться в эмбриональных клетках кур. Однако такие клетки при непермиссивной температуре проявляли все признаки трансформированного фенотипа, и инфекционное потомство RSV могло быть получено при непермиссивной температуре суперинфекцией таких клеток немутантными вирусами-«помощниками». Типоспецифические и gs-антигены обнаруживались в трансформированных клетках при 41°, и, что особенно интересно, такие клетки при непермиссивной температуре продуцировали громадное количество неинфекционных частиц С-типа ALV. Перенос клеток, трансформированных ts-672, в пермиссивную температуру приводил к выделению такими клетками инфекционного потомства RSV в течение 90 мин. после переноса. Очевидно, что ts-672 RSV имеет мутацию гена, необходимого для созревания инфекционного потомства, и этот ген у мутантного вируса может быть комплементирован нетрансформирующими вирусами типа RAV.

Ранее были приведены данные Фриса и др. (Friis et al., 1971) о ts-мутантах RSV-ts-75 и ts-149, мутантные функции которых затрагивали при непермиссивной температуре одновременно (координированно) обе функции недефектного штамма вируса Рауса — способность размножаться и трансформировать клетки. Овада и Тойошима (Owada, Toyoshima, 1973) более подробно изучили один из этих координационных мутантов — мутант ts-75 (или 334 по новой номенклатуре). Мутантные вирионы, не способные трансформировать эмбриональные клетки кур, были не способны и к размножению при непермиссивной температуре. В то же время коинфекция клеток мутантным вирусом и RAV-вирусами не вела к образованию «фокусов» или к индукции размножения вируса при непермиссивной температуре. Облучая УФ-лучами ts-334 RSV, авторы изолировали безусловные мутанты ts-334 (семь изолятов). Такой мутант (ы) и при пермиссивной температуре утрачивал способность трансформировать клетки (td-мутация) без утраты способности к размножению, сохраняя ts-характер для размножения при непермиссивной температуре. При этом td-мутант ts-334 имел и температурозависимую способ-

ность при освобождении дефектного вируса Рауса из трансформированных клеток. При коинфекции клеток ts-334 и RAV-1 были получены рекомбинанты, обладавшие способностью размножаться (но не трансформировать клетки) при непермиссивной температуре. Рекомбинанты характеризовались трансформирующими свойствами ts-334 RSV и мембранной антигенностью RAV-1. Полученные данные говорят о двойной мутации вируса ts-334. Td-дефект ts-334 RSV, возможно, связан с потерей «а»-субъединицы РНК вируса (см. главу VII). Более того, невозможность получить ревертанты по td-мутации говорит о том, что скорее всего здесь происходит именно делеция в геноме саркоматозного вируса. Сходные сегрегаты могут быть получены не только при облучении RSV ультрафиолетом, но и спонтанно (Vogt, 1971).

Координационные мутанты недефектного штамма RSV (Прага) получили и Линиал и Мэзон (Linial, Mason, 1973) — ts-335 и ts-337. Мутантная функция была связана как со способностью размножаться, так и трансформировать клетки; способность вируса к адсорбции и пенетрации при непермиссивной температуре не уменьшалась, но мутантная функция проявлялась в очень ранний период инфекции (спустя 2 часа после инфекции). Полученные авторами данные показали, что мутантная функция необходима для инициации обоих свойств вирионов — размножения и трансформации, но не для их сохранения. Оба мутанта содержали ts-чувствительный структурный компонент, который являлся обратной транскриптазой. Коинфекция клеток ts-335 или ts-337 с RAV вирусами не приводила к продукции генетически стабильных вирионов данного типа (Verma et al., 1974).

Мутанты типа rd-неусловные, утратившие способность к репликации, но сохранившие способность трансформировать клетки, также были описаны — по существу они представляют собой дефектный вирус RSV, основным прототипом которого является штамм Брайан (RSV-B). RSV-B дефектен в способности синтезировать или составлять гликопротеид, детерминирующий фенотипическую экспрессию вируса, связанную с субгрупповой специфичностью (см. Hanafusa et al., 1963; Reamer, Okazaki, 1971; Scheele, Hanafusa, 1971). Rd-Мутант RSV (штамм Ш-Р, — недефектный штамм) описан недавно Каваи и Ханафуза (Kawai, Hanafusa, 1973). Этот штамм вел себя совершенно аналогично дефектному штамму RSV-B: он трансформировал клетки *in vitro*, которые приобретали характерную морфологию. Такие клетки выделяли неинфекционные вирусные частицы, не обладавшие характерным гликопротеидом. Коинфекция этими частицами клеток вместе с инактивированным УФ вирусом Сендай вела к трансформации клеток. Коинфекция трансформированных клеток RAV вела к индукции соответствующих дефектных псевдотипов. Мутант был стабилен, и невозможность получения ревертантных

форм говорит о делеции части генов, ответственных за образование полных инфекционных форм вируса.

Из перечисленных работ очевидно, что в системе вирусов группы лейкозно-саркоматозного комплекса птиц трансформация и репликация — независимые функции, контролирующиеся разными генами. Ген, ответственный за синтез обратной транскриптазы, необходим для проявления обеих функций; механизм этого феномена подробно обсужден в главе 7. Следует добавить, что обратная транскриптаза трансформирующего штамма и RAV сходны между собой и могут комплементироваться (Huang, 1973).

Изучение мутантов вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса мышей в настоящее время по существу еще только начато. Так, Скольник и др. (Scolnick et al., 1972c) впервые выделили *ts*-мутанты MSV, *ts*-мутантная функция которых была необходима для сохранения статуса трансформации непродуцирующих вирус трансформированных клеток крыс. Стефенсон и Ааронсон (Stephenson, Aaronson, 1974) описали *ts*-мутанты RLV, мутантная функция которых была необходима для инициации размножения и фиксации трансформации клетки MSV.

Изученные мутанты не синтезировали *gs-1 p-30* MuLV при перmissive температуре и являлись по срокам выявления мутантной функции ранними. Генетическая информация MSV в непродуцирующих клетках не комплементировала, таким образом, с мутантной функцией изученных *ts*-мутантов MuLV. Не исключено, что мутантная функция штаммов, описанных Стефенсоном и Ааронсоном (Stephenson, Aaronson, 1974), связана с обратной транскриптазой; однако имеющаяся информация об этих *ts*-мутантах еще недостаточна для окончательных выводов.

Координационный безусловный мутант MSV был описан Сомерс и Китом (Somers, Kit, 1973). Этот вирус аналогичен RSV и был дефицитен по обратной транскриптазе. Другой мутант MSV также описан Сомерс и др. (Somers et al., 1973). Авторы получили клональную линию клеток почек крыс, трансформированную MSV-M. Клетки этой линии выделяли вирус MSV-1 (NRK), который мог трансформировать нормальные клетки почек крыс, но был лишен способности размножаться в них; иными словами MSV-1 (NRK) содержал генетическую информацию, необходимую только для трансформации, но не для размножения (по существу *rd* — безусловный мутант MSV). При этом оказалось, что этот вирус является холодным мутантом по свойству трансформировать клетки — перmissive для выявления трансформированного фенотипа клеток, инфицированных этим вирусом, являлась температура 39°. При переносе клеток, трансформированных этим штаммом вируса, в температуру 33° они ревертировали к нормальному фенотипу. Перенос в перmissive температуру (39°) восстанавливал их трансформированный фенотип. Суперинфекция

трансформированных клеток при непермиссивной температуре вирусом лейкоза Молони вела к проявлению трансформированного фенотипа. Следовательно, лейкозные вирусы несут определенные функции, необходимые для экспрессии статуса трансформации. Последние данные подтвердились и в работе Бэссин и др. (Bassin et al., 1971), которые использовали свойство лейкозных вирусов изменять фенотип клеток S<sup>+</sup>L<sup>-</sup>, несущих геном MSV для титрования лейкозных вирусов. Экспрессия генов холодного мутанта, ответственных за статус трансформации, при переносе из непермиссивной в пермиссивную температуру не подавлялась ингибиторами синтеза ДНК и РНК, но подавлялась ингибиторами синтеза белка и гликопротеинов. Количество вирусспецифической РНК в трансформированных клетках при пермиссивной и непермиссивной температуре было идентично (Somers et al., 1973). Эти результаты говорят о том, что экспрессия трансформации в этой системе контролируется на уровне трансляции (или даже посттрансляции), а не на уровне транскрипции.

**РЕЗИСТЕНТНОСТЬ  
ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК  
К РЕИНФЕКЦИИ ГОМОЛОГИЧНЫМИ  
ДНК-СОДЕРЖАЩИМИ  
ОНКОГЕННЫМИ ВИРУСАМИ**

Фогт и Дальбекко (Vogt, Dulbecco, 1960) впервые обратили внимание исследователей на то, что клетки мышей и хомячков, трансформированные *in vitro* вирусом полиомы, становились резистентными к реинфекции гомологичным вирусом. Эти данные можно было трактовать как прямую аналогию с иммунитетом лизогенной бактериальной клетки, несущей профаг, к суперинфекции гомологичным фагом (см. также Ирлин, Зильбер, 1962). Однако впоследствии эту аналогию подтвердить не удалось. Как для вируса полиомы, так и для SV40 характерно почти полное отсутствие размножения в ткани хомячков (непермиссивная или полупермиссивная система). Число клеток, гибнущих в результате продуктивной инфекции в этих системах, вряд ли превышает 2—5%. С другой стороны, в системе клетка мыши — вирус полиомы трансформации культуры предшествует гибель громадного большинства клеток от цитопатогенного действия вируса, и резистентность трансформированной клетки, возможно, обусловлена селекцией резистентных вариантов. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что клетки культур полиомных опухолей не только чувствительны при реинфекции к цитопатогенному действию вируса, но в них происходит и интенсивное размножение вируса полиомы. Степень чувствительности разных полиом-



ных опухолей колеблется в широких пределах и не зависит от спонтанного образования вируса полиомы в таких культурах (Hellström, 1963). Возможно, *in vivo*, где концентрация вируса на клетку никогда не достигает таких величин, как *in vitro*, цитопатогенное действие выражено в значительно меньшей степени и, следовательно, отсутствует селекция резистентных клеточных вариантов.

Интересно, что селекция вирусрезистентных клеток может происходить спонтанно при отсутствии вируса, в процессе простого пассирования опухолевой ткани *in vivo*. Описано спонтанное «выщепление» довольно большого количества резистентных клеток из чувствительных к цитопатогенному действию вируса культур «полиомных» опухолей. В процессе пассирования имеет место и обратный процесс: спонтанное появление чувствительных клеток даже из клональной резистентной линии (Winocour, Sachs, 1962; см. Ирлин, 1964; Tooze, 1973).

В пользу того, что резистентность популяции клеток «полиомных» опухолей мышей связана с отбором, говорит и большая резистентность клеток первых пассажей опухоли (вирус, как правило, еще присутствует) к цитопатогенному действию вируса полиомы, чем более поздних. Следует подчеркнуть, что во всех этих случаях как резистентные, так и чувствительные варианты «полиомных» опухолей — прямой результат опухолевой трансформации клеток вирусом (см. Hellström, 1963).

Шлезингер и др. (Shlesinger et al., 1966) показали, что в отличие от такой variability и чувствительности клеток «полиомных» опухолей к гомологичной реинфекции все изученные ими культуры опухолей хомячков, индуцированных аденовирусом типа 12 (в том числе 13 клональных сублиний), были значительно более резистентны к реинфекции аденовирусом типа 2, чем нормальные клетки хомячков или клетки, трансформированные SV40. Резистентность, как и в случае полиомы, не связана с каким-либо ингибитором типа интерферона и была специфична. Строгл и др. (Strohl et al., 1966, 1970) детально проанализировали природу резистентности клеток опухолей, индуцированных аденовирусом типа 12 и клеток ВНК-21, трансформированных аденовирусом типа 2 *in vitro*, к реинфекции аденовирусом типа 2. Резистентность клеток не была обусловлена низкой степенью адсорбции вируса клетками. Только очень небольшое число клеток в популяции (0,04%) становилось вирус-продуцирующим при реинфекции. Однако почти все реинфицированные клетки при высокой множественности заражения образовывали неинфекционный структурный антиген(ы) вирусной частицы. При этом инфицированные клетки погибали. Синтез ДНК был необходим для образования этого неинфекционного антигена(ов). Авторы высказывают предположение о том, что при-

сутствующая в опухолевых клетках генетическая информация аденовируса типа 12, так же как и в случае профага в лизогенной клетке, блокирует синтез белков (а), необходимых для созревания вируса или сборки его компонентов. В последующем сообщении из этой лаборатории (Champe et al., 1972) было показано, что экстракты опухолей хомячков, индуцированных аденовирусом типа 12, специфически подавляли размножение этого вируса в эмбриональных клетках хомячков. Фактор, содержащийся в экстрактах, разрушался проназой, но был резистентен к ДНК-азе и РНК-азе. Механизм действия экстракта связан с резким снижением урожая вируса в инфицированной клетке, но не влиял на процессы адсорбции и пенетрации аденовируса или индукции им синтеза Т-антигена.

В последние годы можно отметить вновь проявившийся интерес к этой проблеме. На модели клетки почек зеленых мартышек — вирус SV40 специфическая резистентность трансформированных клеток к реинфекции гомологичным вирусом в общем была подтверждена (см. Sambrook, 1972; Tooze, 1973; Rapp, Trulock, 1970), и при детальном изучении было показано, что это не связано с потерей клетками способности адсорбировать вирус. Однако в отличие от нормальных клеток лишь небольшая часть адсорбированного вируса претерпевала процесс «разведения» (Hahn, Sauer, 1971; Barbanti-Brodano et al., 1970; Sauer, Hahn, 1970). При инфекции таких клеток препаратами ДНК вируса SV40 они начинали продуцировать инфекционный вирус (Swetley et al., 1969; Kit et al., 1971). Аналогичные результаты были получены и при «реинфекции» препаратами ДНК вируса SV40 трансформированных клеток человека (Kit et al., 1971).

Обработка трансформированных SV40 клеток почек зеленых мартышек различными клеточными гомогенатами, препаратами гистона или ДЕАЕ-декстраном снимала резистентность трансформированных клеток к гомологичному вирусу (Barbanti-Brodano et al., 1970). Авторы приводят данные о резком повышении в этом случае трансформированными клетками способности адсорбировать вирус после обработки указанными препаратами. Не исключено, что все они способствовали и процессу «разведения» вируса. Клетки почек зеленых мартышек, трансформированные SV40, оказались, в отличие от контрольных, перmissive для размножения аденовирусов человека. Более того, гибриды SV40 — аденовирус типа 7 или 2, содержащие дефектный геном SV40, также размножались в таких клетках (Rapp, Trulock, 1970; Shiroki, Shimojo, 1971). Эти данные, а также сведения, приведенные выше, говорят о том, что резистентность трансформированных клеток к реинфекции гомологичным вирусом не связана с определенным, специфическим репрессором размножения вируса (см. Cassingena, Tournier, 1968; Jensen, Koprowski, 1969; Cassin-

gena et al., 1969, Suarez et al., 1970). Преодоление определенного барьера в клетке инфекционным агентом ведет к индукции инфекционного процесса. Следует при этом подчеркнуть, что даже в одной системе (клетки почек зеленых мартышек — вирус SV40) имеется значительная вариабельность различных трансформированных клеток к реинфекции как цельным вирусом, так и препаратами ДНК вируса (Shiroki, Shimojo, 1971; Kit et al., 1971; см. также Tooze, 1973).

При всей разноречивости приведенных для разных систем данных следует иметь в виду следующее. При трансформации перmissiveй клетки (мышей для вируса полиомы или почек зеленой мартышки для SV40) ДНК-содержащим вирусом «блок» вегетативного цикла вируса — необходимое условие для трансформации клетки. Если трансформация вызвана дефектной вирусной частицей, утратившей способность к репликации, отсутствие резистентности опухолевой клетки к реинфекции гомологичным вирусом легко объяснимо. Сложнее решить вопрос в том случае, когда трансформация перmissiveй клетки получена полной инфекционной вирусной частицей. Для вируса SV40 такие системы описаны (см. главу 5). Было выдвинуто предположение (см. Kit et al., 1971) о существовании в перmissiveй клетках фактора, необходимого для вегетативного роста вируса. В перmissiveй клетках такой фактор отсутствует. По-видимому, количество этого фактора резко снижается и в быстро делящихся перmissiveй клетках, что и позволяет получать трансформацию перmissiveй клеток полным вирусом.

Данные, полученные на модели клетки почек зеленых мартышек — вирус SV40 показывают, что механизм чувствительности или резистентности трансформированных клеток к реинфекции, возможно, зависит и от того, каким вирусом — полным или дефектным — получена трансформация. В случае трансформации клеток полным вирусом в культуре одновременно идет отбор (как и в системе вирус полиомы — эмбриональная клетка мышей) резистентных к цитопатогенному действию вируса клеточных вариантов. Полученные из таких «массовых» культур трансформированные линии, как правило, высокорезистентны не только к реинфекции вирусом SV40, но и к ДНК вируса, хотя определенная степень вариабельности этого признака у разных линий имеет место. При трансформации же клеток дефектным, неполным вирусом SV40 трансформированные клетки, не подвергавшиеся предварительному отбору на резистентность, как правило, высокочувствительны к реинфекции (см. Swetley et al., 1969; Rapp, Trulock, 1970; Kit et al., 1971; Shiroki, Shimojo, 1971; Tooze, 1973).

Аналогичные опыты по определению чувствительности трансформированных клеток к реинфекции гомологичным вирусом

были проведены и на модели вируса герпеса. Так, Рапп и Даф (см. Rapp, 1973) показали, что клетки, трансформированные облученным УФ вирусом герпеса типа 2 становились резистентными к гомологичной реинфекции.

Подробное исследование чувствительности клеток лимфомы Бэркитта к реинфекции EBV было проведено в лаборатории Кляйна (Klein, 1973). Реинфекция непродуцирующих клеток линии Raji EBV вела к индукции вирусиндуцированных мембранных антигенов и ранних антигенов вируса, а в небольшой части клеток при очень высоких дозах заражения и к индукции мембранных антигенов вириона. Однако, как правило, вирусный цикл был абортивным, и не удавалось при инфекции непродуцирующих линий ЛБ получить вируспродуцирующие линии.

При реинфекции EBV вируснепродуцирующих линий лимфомы Бэркитта было показано, что все они адсорбируют вирус, однако только в части таких культур реинфицирующий вирус индуцирует образование ранних антигенов. Только половина продуцирующих EBV линий адсорбировала реинфицирующий вирус; примерно в половине из них он индуцировал образование ранних антигенов. Эти данные говорят о том, что интегрированный геном EBV в опухолевых клетках может обладать функцией репрессора онтогенеза полного цикла вируса, причем эта его функция может быть реализована как на уровне адсорбции вируса, так и блокированием каких-то внутриклеточных стадий вирусного цикла (см. Klein, 1973).

Позднее Кляйн и Домбос (см. Klein, 1973) сравнили чувствительность различных клеточных линий ЛБ к реинфекции EBV и активацию в них BudR или IudR вирусных антигенов EBV или самого вируса. Авторы показали, что линии, чувствительные к реинфекции, были и более индуцибельными; клеточные линии, нечувствительные к реинфекции, но адсорбирующие вирус, были также резистентны и к индукции вирусных антигенов BudR или IudR. У линий, утративших способность к адсорбции вируса, значительно менялась чувствительность к индукции вирусных антигенов. Все эти данные говорят о возможности существования в опухолевых клетках «негативного» контроля продуктивного цикла EBV. Так как лимфоидные клетки являются перемиссивными для EBV, резистентность опухолевых клеток в этой системе не может быть связана с отбором резистентных к вирусу вариантов.

Проблема резистентности клеток к реинфекции онкогенным вирусом группы герпеса может иметь общее значение. Выше мы приводили примеры убиквитарности не только EBV, но и HVS, HVA и вируса БМ у своих природных хозяев. Более того, эти вирусы в геномной, латентной форме могут обнаруживаться в нормальных лимфоидных клетках. Не связано ли именно такое



носительство низкопатогенных вариантов герпесных вирусов с резистентностью природных хозяев (например у HVS) к онкогенному действию высокопатогенного варианта?

#### «РЕВЕРСИЯ» ТРАНСФОРМАЦИИ

##### *ДНК-содержащие вирусы*

Стокер (Stoker, 1968) показал, что при высокой множественности инфекции РУ клеток ВНК-21 более 50% инфицированных клеток характеризуется трансформированным фенотипом в первые дни после инфекции. Однако у большинства клеток эта трансформация носит транзиторный характер, и, после нескольких делений, такие клетки «нормализуются». Аналогичный феномен независимо наблюдали и мы при инфекции РУ клеток хомячков эмбриональной ткани (см. Ирлин, 1973). В обоих случаях реверсия характеризовалась утратой способности инфицированных клеток расти в агаре. Стокер назвал обнаруженный феномен абортивной трансформацией и в работе, выполненной им год спустя вместе с Дальбекко, представил доказательства тому, что обратимость трансформации в этой системе, возможно, связана с нестабильностью связи вирусной ДНК с клеточным геномом (Stoker, Dulbesso, 1969). Однако позднее Смит и др. (Smith et al., 1972), анализируя клетки, «нормализовавшиеся» после абортивной трансформации их SV40, обнаружили в геноме таких клеток геном вируса SV40 в количествах, эквивалентных числу вирусных геномов в трансформированных клетках.

Возможность реверсии клеток, стабильно трансформированных РУ и прошедших множество пассажей *in vitro*, впервые показали Марин и Литлфильд (Marin, Littlefield, 1968). Отбирая клетки, резистентные к тиогуанину (что было связано с потерей части хромосом), из популяции трансформированной РУ тетраплоидной линии клеток хомячков ВНК-21, авторы получили клеточные варианты, утратившие свойства «трансформированного» фенотипа. Ревертантные клоны приобрели чувствительность к КТ (flat-реверсия или способность расти в виде монослоя), их онкогенность снижалась, исчезали Т-антиген РУ и специфический вирусиндуцированный трансплантационный антиген. Наиболее доказательной была ретрансформация таких ревертантов вторичным заражением их РУ (Marin, Macpherson, 1969). Так как все изученные ревертанты имели редуцированный по сравнению с исходной популяцией клеток хромосомный набор, авторы высказали предположение, что устойчивые к тиогуанину ревертанты теряют хромосомы, обуславливающие «трансформированный» фенотип клетки. При этом селекционирующий фактор совсем не обязательно должен быть тиогуанином; ревертанты могли быть

отобраны по признаку неспособности к росту в агаре — в этом случае среди ревертантов были как чувствительные, так и резистентные к тиогуанину клоны. Ряд клонов-ревертантов сохранял способность синтезировать различные количества Т-антигена РУ. Не было обнаружено корреляции между количеством Т-антигена и чувствительностью клеток к КТ.

В то же время в клетках четырех клональных сублиний ревертантов с самой низкой эффективностью клонирования в агаре Т-антиген обнаруживался в следовых количествах или полностью отсутствовал. Тот факт, что потеря трансформированными клетками хромосом коррелировала с появлением клонов-ревертантов с различной степенью утраты «трансформированного» фенотипа, говорит, возможно, о том, что фенотип трансформированной клетки детерминируется множественными генами, локализованными при этом в разных хромосомах (Marin, 1971). Вайк (Wyke, 1971) для отбора полиомных ревертантов в этой же системе применил метод негативной селекции ДНК-синтезирующих клеток. Принцип метода основан на том, что активно растущие клетки включают аналог тимидина —  $\text{BudR}$ ; после облучения таких клеток видимым светом они гибнут; в то же время клетки, для которых данная среда не будет «пермиссивна», не будут размножаться и, следовательно, не будут включать аналог. Облучение таких клеток не ведет к их гибели. Пересев выживших клеток на пермиссивную для них среду позволяет выделить из популяции клеточные варианты. Этим методом Вайку удалось из клональной популяции трансформированных клеток отобрать варианты, неспособные к росту в агаре. Одна из таких линий характеризовалась чувствительностью к КТ, но была онкогенна и содержала Т-антиген. Число хромосом в клетках этой линии было уменьшено по сравнению с родительской. Описана спонтанная ретрансформация клеток этой линии. Попытки же ретрансформировать такие клетки РУ оказались неудачны. Во всех случаях речь шла не о полной реверсии «трансформированного» фенотипа к нормальному, а скорее об утрате тех или иных дискретных свойств трансформированной клеткой — чувствительности к КТ, способности к росту в агаре, вирусспецифической антигенности и т. д. (см. подробно Pollack, Hough, 1974).

• Ревертанты по признаку чувствительности к КТ (flat-ревертанты) изолировали Поллак и др. (Pollack et al., 1968) методом негативной селекции. Онкогенность таких клеток была снижена, и они не агглютинировались лектинами. При этом клетки-ревертанты сохраняли Т-антиген и вирусспецифическую РНК (Ozanne et al., 1973). Реверсия сопровождалась изменением структуры наружной мембраны клеток и активного транспорта сахаров. Наблюдалась также и обратная спонтанная реверсия (см. Pollack et al., 1970, Pollack, Hough, 1974).

Аналогичные ревертанты получили Калп и Блэк (Culp, Black, 1972), использовавшие несколько иной принцип их получения. Авторы получили flat-ревертанты клеток ЗТЗ, трансформированных SV40, при селективном отборе их КоnА, который в высоких концентрациях токсичен для трансформированных клеток. Полученные ревертанты обладали чувствительностью к КТ, содержание в них нуклеиновых кислот соответствовало количеству их в клетках ЗТЗ. Однако такие flat-ревертанты синтезировали Т-антиген SV40, содержали полный геном вируса и характеризовались «пониженными требованиями» к количеству сыворотки в среде. Хромосомные наборы flat-ревертантов были выше, чем у исходной трансформированной линии. Интересно, что эти flat-ревертанты синтезировали коллаген в тех же количествах, что и трансформированные клетки. Во всех указанных выше системах частота реверсии была крайне низкой: 1 на  $10^4$  —  $10^5$  трансформированных клеток клонированной популяции.

Надо сказать, что практически все описанные выше ревертанты клеток ЗТЗ, трансформированных SV40, характеризовались главным образом реверсией одного признака трансформированной клетки такого, как способность к многослойному росту, к росту со значительно более высокой плотностью, чем нормальные клетки. Чувствительность же клеток-ревертантов к росту при низких концентрациях сыворотки в среде в общем соответствовала уровню трансформированных родительских клеток. Это определялось в основном использованными методами селекции ревертантов. Фогель и Поллак (Vogel, Pollack, 1973) использовали для получения нового типа ревертантов метод негативной селекции при редком засеве и росте клеток в среде с низкой концентрацией сыворотки. Они получили ревертанты трансформированных клеток, характеризующиеся «требованиями» к концентрации сыворотки в среде на уровне или даже выше нормальных клеток ЗТЗ. Такие «сывороточные» ревертанты содержали Т-антиген вируса SV40 и вирусспецифическую РНК на уровне исходной трансформированной родительской линии. Они были резистентны к ретрансформации вирусом SV40, но успешно трансформировались MSV. Хромосомные наборы «сывороточных» ревертантов были выше, чем у исходной трансформированной линии.

Если суммировать данные, полученные при изучении свойств различных ревертантов клеток ЗТЗ, трансформированных SV40, то создается впечатление, что реверсия к «норме» такого свойства трансформированной клетки, как многослойный рост или способность к росту при высокой плотности засева, сопровождалась и реверсией другого признака — способности роста во взвеси или в агаре. В то же время такой признак трансформированной клетки, как способность к росту при низкой концентрации сыворотки у этих ревертантов сохранялся. Однако все описанные

«сывороточные» ревертанты приобретали чувствительность к КТ (см. Vogel, Pollack, 1973).

Рабинович и Закс (Rabinowitz, Sachs, 1968) для получения большого количества и отбора ревертантов применили оригинальный метод выращивания трансформированных клеток на монослое нормальных клеток, фиксированных глутаральдегидом. В этой системе клетки, обладающие КТ, имели селективное преимущество. Полученные в этой системе ревертанты характеризовались чувствительностью к КТ, сниженной эффективностью клонирования на стекле и в агаре, низкой онкогенностью, отсутствием полиомного трансплантационного антигена, но Т-антиген у них сохранялся. Ревертанты также утрачивали способность к росту при 41° и агглютинабельность лектинами. Отмечалась значительная вариабельность всех этих свойств у различных клональных линий ревертантов. Наблюдалась также обратная спонтанная реверсия, причем такая реверсия была дискретна — реверсия одного из признаков не вела к реверсии другого или остальных (см. Rabinowitz, Sachs, 1968, 1970, 1972).

В опытах Поллака и др. (Pollack et al., 1970) и Рабиновича и Закса (Rabinowitz, Sachs, 1970) реверсия трансформации сопровождалась, как правило, увеличением общего числа хромосом в клетках-ревертантах. Повторная реверсия вновь характеризовалась уменьшением модального числа хромосом (Pollack et al., 1970).

Блох-Штахер и др. (Bloch-Shtacher et al., 1972) описали способ получения большого количества «полиомных» ревертантов при редком засеве клеток без «кормилки» из облученных клеток. Они показали, что, как правило, ревертанты в отличие от околодиплоидной трансформированной линии были анеуплоидны (в основном субтетраплоидны). По данным авторов, механизм такой анеуплоидной реверсии включает в себя образование из двуядерных трансформированных клеток полиплоидных клеток, которые в процессе митоза теряют часть хромосом. Еще раз следует подчеркнуть, что в большинстве работ ревертанты теряли главным образом трансформированный фенотип, в то время как вирусный геном в клетке сохранялся. Речь идет, таким образом, по-видимому, не столько об истинной реверсии (утрате) статуса трансформации, сколько о регуляции на генном, хромосомном или эпигеномном уровне трансляции или транскрипции вирусного генома. Это особенно подчеркивается тем, что как субдиплоидные, так и субтетраплоидные ревертанты «полиомных» клеток содержали в своем геноме одинаковое с трансформированными клетками количество ДНК РУ (Shani et al., 1972).

Следовательно, могут быть по крайней мере два механизма реверсии «трансформированного» фенотипа в «нормальный»: один, связанный с потерей всего или части вирусного генома вместе



с частью хромосом. Другой механизм реверсии предложен группой Закса. По модели авторов, контроль трансформированного фенотипа или его реверсия к норме определяется балансом генов экспрессии и генов подавления злокачественности. Эти гены могут быть локализованы в разных хромосомах; гены экспрессии существуют и в нормальных клетках, но их действие «нейтрализовано» генами подавления. Злокачественность выявляется или при увеличении генов экспрессии или при уменьшении генов подавления. Канцерогены могут индуцировать опухоль при изменении баланса между генами экспрессии и генами подавления, а реверсия в норму может происходить и без реверсии к диплоидному набору клеток (см. Hitotsumachi et al., 1973; Rabinowitz, Sachs, 1972). Последующие работы с использованием новой техники окраски хромосом позволили авторам выделить в хромосомном наборе клеток золотистого хомячка восемь групп хромосом и проанализировать возможные варианты генов экспрессии и генов подавления. Авторы считают, что им удалось локализовать на уровне хромосом: гены экспрессии—хромосома 5<sub>6</sub> и гены подавления—хромосома 5<sub>3</sub> в случае трансформации, вызванной РУ. Так, в клетках всех изученных ими полиомных опухолей обнаруживалась утрата участка хромосомы 5<sub>3</sub> или увеличение и удвоение хромосомы 5<sub>6</sub> (Jamamoto et al., 1973).

Новый подход к изучению механизма реверсии трансформации был получен при исследовании *ts*-мутантов клеток, трансформированных SV40 (Renger, Basilico, 1972). Такие клеточные мутанты имели характерный трансформированный фенотип при 32° (пермиссивная температура), но утрачивали его при 39°. Четыре параметра роста были *ts*-чувствительны в описанной клеточной линии: 1) плотность роста, 2) способность к образованию колоний на монослое клеток ЭТЗ, 3) синтез клеточной ДНК и 4) агглютинация лектинами. Чувствительность роста клеток к концентрации сыворотки в среде была одинакова при обеих температурах. Существенно, что *ts*-мутация в этой линии была клеточная, а не вирусная, так как при гетерокарионизации с индикаторными клетками индуцировался «дикий» тип SV40. Характерно, что инфекция этих клеток MSV вела к приобретению ими трансформированного фенотипа при любой температуре (Renger, 1972).

В последующей работе Ренджер и Базилико (Renger, Basilico, 1973) подтвердили клеточную (а не вирусную) природу *ts*-мутации. Если такую культуру, достигшую высокой плотности многослойного роста при пермиссивной температуре, перенести в непермиссивную, то синтез ДНК в клетках резко падал и большинство клеток в течение 24 час. гибло, а часть оставшихся в живых клеток сохраняла плотность роста, характерную для роста этих клеток при пермиссивной температуре.

*РНК-содержащие вирусы*

Впервые реверсия трансформации в этой системе была описана Макферсоном (Macpherson, 1965) на модели вируса Рауса. Он показал, что из трансформированных RSV (штамм Шмидт-Руппин) клонов клеток хомячков линии ВНК-21 можно было при реклонировании получать «нормальные» ревертанты, которые утрачивали способность вызывать опухоли или расти в агаре. У «ревертантов» восстанавливалась способность к КТ и резко снижалась онкогенность. В таких клетках не удавалось обнаружить *gs*-антиген группы ALV, и биологические и серологические данные показывали, что в этом случае действительно происходила спонтанная потеря трансформированными клетками генома вируса Рауса. Подобные ревертанты можно было повторно трансформировать вирусом Рауса и затем вновь при реклонировании получить «нормальные» ревертанты (см. подробно Macpherson, 1972). Таким образом, из данных Макферсона следовало, что реверсия трансформированных вирусом Рауса клеток сопровождается (и обусловлена) потерей интегрированного генома.

Позднее Боттигер (Boettiger, 1974), Денг и др. (Deng et al., 1974) детально и более чувствительными методами проанализировали эту модель и показали, что в клетках-ревертантах геном RSV сохраняется. Такие клетки содержат интегрированную в клеточный геном вирусспецифическую ДНК в таких же количествах, что и трансформированные (около одного генома RSV на клетку); более того, методом гетерокарионизации (см. ниже) из таких клеток удается выделить инфекционный вирус Рауса, однако частота индукции вируса этим методом была значительно более низкой по сравнению с трансформированными клетками. Обработка клеток-ревертантов BudR значительно повышала частоту индукции вируса. Было отмечено значительное снижение количества вирусспецифической РНК в клетках-ревертантах по сравнению с трансформированными клетками. Все приведенные данные говорят о том, что в этой системе реверсия «трансформированного» фенотипа, вероятно, обусловлена изменением (снижением) уровня транскрипции интегрированного генома RSV.

Морфологические ревертанты, сохраняющие интегрированный геном вируса саркомы птиц или мышей и аналогичные ревертантам клеток, трансформированных РУ или SV40, были описаны Стефенсоном и др. (Stephenson et al., 1972). Такие ревертанты были практически неонкогенны и по многим биохимическим признакам идентичны нормальным клеткам. Однако в таких ревертировавших клетках постоянно обнаруживался *gs*-антиген MuLV или ALV. Такие ревертанты были резистентны к ретрансформации гомологичным вирусом, но сохраняли чувствительность

к трансформации гетерологичным ДНК- и РНК-содержащим онкогенным вирусом (Stephenson et al., 1973).

Номура и др. (Nomura et al., 1972a, b) выделили спонтанные flat-ревертанты клеток 3Т3, трансформированных MSV. Они характеризовались «нормальным» фенотипом роста *in vitro*, не продуцировали С-тип частиц, но могли независимо от этого содержать или не содержать gs-антиген вируса MuLV. В таких клетках не удавалась индукция вируса саркомы. Отмечалась высокая чувствительность flat-ревертантов к инфекции вирусами MSV и MuLV. Описанные flat-ревертанты спонтанно ретрансформировались с частотой, различной в разных сублиниях. Ретрансформанты характеризовались трансформированным фенотипом роста *in vitro*, но способность к индукции MSV в клетках не восстанавливалась и они сохраняли чувствительность к реинфекции MuLV и MSV. Удивительно, что ретрансформанты утрачивали способность к синтезу gs-антигена. Сами flat-ревертанты характеризовались повышенным модальным классом хромосом, а спонтанная ретрансформация вела к его снижению. Частота flat-ревертантов резко увеличивалась при обработке клеток FudR или колцемидом. При этом были получены ревертанты, характеризующиеся нормальным модальным классом хромосом или даже снижением числа хромосом (Nomura et al., 1973a, b). Интересно, что авторы получили и спонтанные ретрансформанты клеток, содержащих индуцибельный геном MSV.

Продолжая эту серию исследований, Фишингер и др. (Fischinger et al., 1974) реинфицировали полученные ими flat-ревертанты вирусом MSV. При этом получено несколько типов метастабильных ретрансформантов: первый тип ретрансформантов был идентичен родительским  $S^+L^-$ -трансформированным клеткам с той только разницей, что MSV в таких клетках индуцировался IudR (в отличие от исходных). Спонтанная реверсия при этом отсутствовала. Второй тип ретрансформантов давал чрезвычайно высокое (около 95%) количество неиндуцибельных ревертантов (вторичные ревертанты). Однако после пассирования таких клеток возникал стабильный трансформированный фенотип: в ряде случаев вторичные ревертанты при пассировании вторично ретрансформировались (без добавления MSV), и при инфекции их MuLV удавалось освободить геном MSV. Следовательно, геном MSV в таких клетках мог персистировать не только в неэкспрессированной форме (по фенотипу клетки), но и в неиндуцибельной. В части ретрансформированных клеток обнаружилась спонтанная продукция MSV с или без продукции MuLV. Вторичные ревертанты в этой линии продуцировали только MuLV.

Применив новую технику отбора ревертантов, основанную на селекции IudR-резистентных клонов в метилцеллюлозе, Гринбер-

гер и Ааронсон (Greenberger, Aaronson, 1974) получили новый тип морфологических ревертантов клеток ЗТЗ, трансформированных MSV-Ki. Полученные ревертанты были чувствительны к КТ, утрачивали способность к росту в метилцеллюлозе; ревертанты по крайней мере в 1000 раз были менее онкогенны, чем исходные трансформированные клетки. В ряде случаев наблюдалась спонтанная ретрансформация клеток ревертантных клонов, правда, с крайне низкой частотой.

Ревертантные клетки содержали интегрированный геном вируса саркомы, который мог быть «освобожден» добавлением вируса MuLV. Частота индукции вируса саркомы в клетках-ревертантах была пропорциональна частоте спонтанной ретрансформации их. Реинфекция ревертантов вела к ретрансформации клеток.

Хатанака и др. (Hatanaka et al., 1973a, b) описали flat-ревертанты клеток, трансформированных MSV, которые, однако, сохраняли свои онкогенные свойства (линия M-50). В то же время полученная таким же образом этими авторами flat-линия (M-43-2), сохранявшая интегрированный и индуцибельный геном вируса саркомы, утрачивала онкогенные свойства. При этом линия M-43-2 имела резко повышенный модальный класс (135 хромосом). Линия M-50, сохранившая свои онкогенные свойства, в то же время резко снизила способность к индукции вируса MSV. Flat-ревертанты клеток ЗТЗ, трансформированных MSV, получили Газдар и др. (Gazdar et al., 1974b) после пассирования клеток при 40,5°. Частота реверсии повышалась при этом в 40 раз. Такие flat-ревертанты характеризовались нормальным типом роста *in vitro*, отсутствием злокачественности и чувствительностью к ретрансформации вирусом MSV. Все ревертанты сохраняли геном MSV в индуцибельной форме. Модальный класс хромосом ревертантов был значительно выше, чем у родительских клеток. Спонтанная ретрансформация вела к утрате КТ и снижению числа хромосом.

Таким образом, мы хотели бы подчеркнуть следующее: совершенно очевидна и не вызывает сомнений возможность определенной и дискретной реверсии каких-то признаков «опухолевого» фенотипа клетки, трансформированной ДНК- и РНК-содержащими онкогенными вирусами. Также очевидно, что механизмы этой реверсии могут быть различными.

У ts-мутантов онкогенных вирусов, где мутантный ген(ы) ответствен за статус трансформации, налицо прямой контроль фенотипа клетки геномом вируса. Имеющиеся факты позволяют говорить о том, что белок(и) — продукт раннего гена(ов) онкогенного вируса и является тем фактором, который осуществляет контроль фенотипа инфицированной клетки. Совершенно очевидно, что выделение этого белка будет во многом способствовать



пониманию нами механизма трансформирующего действия онкогенного вируса и механизма контроля клеточного деления.

Столь же очевидно, что контроль фенотипа трансформированной клетки осуществляется на нескольких уровнях биохимической организации клетки и в ряде систем именно клеточные факторы контроля экспрессии вирусного генома и определяют фенотип инфицированной клетки. Налицо дискретность признаков трансформированной клетки и дискретность их реверсии, а следовательно, дискретность действия контрольных механизмов клетки на интегрированный вирусный геном.

Наши знания этих контрольных механизмов клетки еще весьма ограничены, но существование различных модельных систем с дискретной утратой разных признаков трансформированной клетки позволяет думать о том, что и в этом вопросе мы скоро будем свидетелями быстрого прогресса. Очевидно, большое значение здесь будут иметь мутанты опухолевых клеток, в которых мутантная функция, контролирующая фенотип клетки, трансформированной диким типом онкогенного вируса, будет связана с *ts*-мутацией.

Еще более заманчивой представляется такая модель: клетки, трансформированные «ранним» *ts*-мутантом онкогенного вируса и имеющие одновременно клеточную *ts*-мутацию, контролирующую фенотип клетки, или клетки, трансформированные одновременно двумя разными *ts*-мутантами РНК- и ДНК-содержащих онковирсов. Этот список можно продолжать, по-видимому, до бесконечности, однако и так очевидно, какие большие возможности таят в себе *ts*-мутантные системы.

Столь же перспективным оказался и новый метод идентификации отдельных хромосом кариотипа млекопитающих для изучения механизма реверсии и трансформации клеток. На клеточных гибридах (мышинные фибробласты — диплоидные клетки человека WI-38, трансформированные SV40) было показано, что трансформированный фенотип гибридной клетки зависит от присутствия в хромосомном наборе С7 хромосомы человека. Более того, достаточно было одной этой хромосомы трансформированной клетки при полном наборе в гибриде мышинных хромосом, чтобы фенотип гибридной клетки был трансформированным, а прививка таких клеток мышам-*nude* вела к образованию опухолей на месте введения гибридных клеток. Утрата гибридной клеткой С7 хромосомы трансформированной клетки вела к реверсии трансформированного фенотипа. Подчеркнем, что при утрате любых других хромосом трансформированной клетки человека из гибрида реверсии трансформации не наблюдалось (Gross, Korgowski, 1975).

Эти данные, по-видимому, впервые прямо показывают наличие специфической локализации SV40 в геноме трансформи-

ванной клетки на уровне индивидуальных хромосом, а сама система является очень удобной моделью для изучения механизма трансформации клетки онкогенным вирусом.

#### «БЕССМЕРТНОСТЬ» ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ КЛЕТКИ

Организм и его клетки имеют ограниченный срок жизни. Однако этот закон не относится к опухолевой клетке. Бессчетное количество штаммов опухолевых клеток самых разных видов животных, включая и человека, пассируется десятки лет *in vivo* и *in vitro*, в то время как хозяин первичной опухоли давно погиб. Этот поразительный факт давно привлекает к себе внимание исследователей, однако лишь в последние годы, после получения адекватных моделей *in vitro*, наметился определенный прогресс в изучении этой проблемы. Одной из самых удобных систем в этом плане является «специфическая» пара: нормальная культура и та же самая культура, трансформированная онкогенным вирусом. Высокая частота получения стабильно перевиваемых, «бессмертных» клеточных линий по сравнению с аналогичными контрольными культурами — одна из характерных особенностей клеток, трансформированных *in vitro* онкогенными вирусами.

При эксплантации клеток *in vitro* большинство первичных культур проходит, по данным многих авторов (Бершадский, Гельфанд, 1970; Sanford, 1965), три стадии роста: стадию первичного роста и адаптации (I стадия); стадию активной пролиферации культуры с характерными митотическим индексом и временем удвоения числа клеток, зависящими от типа клеток, состава питательной среды и т. д. (II стадия) и стадию прекращения роста, при которой значительно увеличивается время удвоения культуры, митотический индекс резко падает, отмечается интенсивное слущивание и гибель клеток (III стадия — «кризис» культуры). Часть клеток при этом может сохранить свою жизнеспособность, вновь «спонтанно» начать размножаться и дать, таким образом, начало новой, перевиваемой «бессмертной» клеточной линии или штамму (IV стадия). Частота наступления IV стадии зависит от многих причин, и в том числе, при прочих равных условиях, от видовой принадлежности клеток (Hayflick, 1965, 1973; Sanford, 1965). Описанные стадии характерны как для культур из эмбриональных или взрослых нормальных тканей, так и для культур из опухолей.

Наиболее подробно механизм «выхода» первичной культуры в «бессмертную» линию при инфекции клеток онкогенным вирусом изучен на модели вируса SV40 и клеток эмбрионального легкого человека.

Нормальные эмбриональные серийно культивируемые диплоидные клетки человека имеют ограниченную продолжительность жизни *in vitro*. Общее число пассажей, которые могла пройти любая диплоидная культура эмбриональных клеток до наступления III стадии, было равно  $50 \pm 10$  (при стандартном рассеивании клеток 1:2, что соответствовало в среднем одному делению каждой клетки в каждом пассаже во II стадию роста). Продолжительность стадии активного роста определялась, однако, не числом пассажей, а числом возможных делений каждой клетки, ее «потенциалом деления». Так, при рассеивании клеток 1:8 культура проходит примерно втрое меньше пассажей, чем аналогичная культура, рассеиваемая в отношении 1:2.

На протяжении всей II стадии культивирования диплоидный кариотип сохранялся у всех таких культур. Отмечалось лишь небольшое, характерное для каждой культуры, количество тетраплоидных клеток, которое не превышало 3%. Общее количество клеточных делений культуры до наступления III стадии не менялось при хранении в течение различных сроков при низкой температуре или при использовании клональных субкультур. Наступление III стадии не было вызвано инфекцией культур латентными вирусами, микоплазмами или изменением состава питательной среды (Hayflick, 1965, 1973). Такая «заряженность» клетки на  $50 \pm 10$  делений характеризовала диплоидную культуру эмбриональных клеток; продолжительность II стадии диплоидных культур клеток взрослых людей равнялась примерно  $20 \pm 10$  клеточным удвоениям. Эти данные были многократно подтверждены (Hayflick, 1965). Позднее Мартин и др. (Martin et al., 1970) на основании статистического анализа числа возможных пассажей клеточных культур от доноров разных возрастов показали уменьшение на 0,2 числа удвоений клеточной популяции на год жизни.

Ни одна из изученных диплоидных неинфицированных нормальных культур человека не переживала III стадию и не становилась «бессмертной». Ограниченный срок жизни *in vitro* характерен и для других типов клеток человека — лимфоидных клеток (Chang, 1970) или клеток амниона (Chang, 1968). Для последних число делений также примерно соответствовало 50 (Greene et al., 1973).

По мере приближения III стадии отмечалось в культуре увеличение числа анеуплоидных клеток, появлялись единичные разрывы хромосом, увеличивалось время митотического цикла. В III стадии эти явления быстро нарастали, и начиналась интенсивная гибель клеток. В это время происходило и резкое увеличение доли клеток с измененным кариотипом. Среди появившихся анеуплоидных клеток отмечались типы от гиподиплоидных до гипертетраплоидных; более часты гипотетраплоидные

или близкие к триплоидным варианты. Следует подчеркнуть, что хромосомные нарушения все-таки не накапливаются постепенно в период II стадии, по времени предшествуя «кризису». Как правило, они возникают в определенный момент скачкообразно, так что кажутся скорее следствием III стадии, чем ее причиной (Hayflick, 1965, 1973; Weinstein, Moorhead, 1965).

Причины перехода клеток из II стадии роста в III стадию неизвестны. Не исключено, что получение или использование новых питательных сред для роста клеток *in vitro* изменит сроки окончания II стадии. Так, например, добавление в среду гидрокортизона или тирозина значительно увеличивало срок жизни клеток *in vitro*. Аналогичные результаты были получены при добавлении витамина E (см. Hayflick, 1973). Гайфлик (Hayflick, 1965, 1973) проводит аналогию между III стадией роста культуры *in vitro* и старением *in vivo*. Он выдвигает предположение, что гибель клеток наступает в результате накопления «ошибок» в процессе репликации ДНК и, как следствие этого, — инактивации части клеточного генома. Появление хромосомных аномалий является отражением этого процесса. Несколько иной принцип инактивации генетической матрицы — принцип маргинотомии — для объяснения процесса старения предложен А. Е. Оловниковым (1971). Гарт и Сетлоу (Hart, Setlow, 1974) пытаются связать механизм старения с частотой одонитевых разрывов в молекуле ДНК. Норвуд и др. (Norwood et al., 1974) показали, что в гетерокарионе «старой» и молодой клеток доминирует (по контролю синтеза ДНК в ядре) фенотип «старой» клетки.

По-видимому, диплоидные клетки всех видов животных имеют ограниченный срок жизни *in vitro* (Hayflick, 1973). При этом существует определенная корреляция между максимальной продолжительностью жизни вида и числом удвоений нормальных эмбриональных фибробластов *in vitro*. Данные о сроках жизни *in vitro* эмбриональных фибробластов легкого человека были представлены выше. Куры могут дожить до 30-летнего возраста; число удвоений эмбриональных клеток кур *in vitro* колеблется от 15 до 35. Для мышей эти цифры составляют соответственно 3,5 года и 14—28 удвоений. Ограниченный срок жизни при серийных трансплантациях *in vivo* имеют клетки нормальной молочной железы и костного мозга мышей (Hayflick, 1973). Правда, при изменении метода трансплантации клеток костного мозга удалось резко повысить срок жизни и функционирования этих клеток — до 73 (!) недель, т. е. более, чем вдвое по сравнению с максимальным сроком жизни целого организма (Harrison, 1973).

Два редких схожих заболевания человека — прогерия и синдром Вернера — характеризуются резким сокращением средней продолжительности жизни и повышенной частотой опухолей. В обоих случаях было показано резкое уменьшение числа воз-



можных пассажей *in vitro* фибробластов от этих больных (Goldstein, 1971; Martin et al., 1970).

Гибель клеток — одно из важных и постоянных явлений нормального эмбрионального и постнатального развития. Гибель клеток в онтогенезе происходит во многих частях взрослого организма и у зародыша, она является существенной чертой нормального морфогенеза многих органов, например, при образовании пальцев, разделении губ и десен, формировании век и т. д. Такая гибель, так называемая летальная дифференцировка клеток, происходит в соответствии с нормальной генетической «программой» развития. Примеров генетического запрограммирования гибели клеток при нормальном развитии можно привести много: регрессия личиночных органов при метаморфозе, регрессия клеток мюллеровых каналов в процессе полового созревания самцов, гибель паренхиматозных органов у горбуши в процессе переста, дифференцировка кожного эпидермиса с кератинизацией и гибелью клеток у позвоночных, дифференцировка клеток красного ростка крови и т. д. Генетически обусловленная гибель клеток встречается в любом организме, и совершенно очевидно, что, как и любая дифференцировка, она находится под генетическим контролем. Если эта «программа» нарушена — возникают врожденные дефекты, такие, как синдактилия или сохранение хвоста у человека. Это может быть связано с мутацией какого-то гена, как, например, в случае синдактилии (сращения пальцев) конечностей у человека (Бердышев, 1968; Маркерт, Уршпрунг, 1973). Выживание клеток, которые в процессе нормального развития должны погибнуть, может привести к образованию «эмбриональных» опухолей. Возможный пример таких опухолей — медуллобластомы зернистого слоя мозжечка, а также, по-видимому, симпатические нейробластомы, ретинобластомы, нефробластомы, гепатобластомы.

Трансформация эмбриональных клеток легкого человека вирусом SV40 в течение II стадии роста не предотвращала наступления стадии, характеризующейся интенсивной гибелью клеток, — III стадии роста культуры или «кризиса» (эта гибель клеток не была вызвана цитопатическим действием вируса SV40). Однако в этом случае «кризис» наступал на 9—10 недель позже, чем III стадия роста соответствующей контрольной сублинии. Срок наступления «кризиса» в разных трансформированных эмбриональных культурах человека был одинаков вне зависимости от времени инфицирования. Но в отличие от контрольных культур в трансформированной сублинии всегда небольшое количество клеток выживало, и при осторожном манипулировании из них получали «бессмертные» линии, сохранявшие характерные признаки вирусной трансформации (см. Koprowski et al., 1966).

Аналогичные данные получены и для культур амниона человека (Chang, Sinskey, 1968; Gaffney et al., 1970). Еще более четкие результаты были получены при инфекции человеческих эмбриональных культур вирусом SV40 в III стадию роста. В такой культуре число ДНК-синтезирующих клеток ничтожно, митозы практически отсутствуют. Однако спустя два дня после инфекции митотический индекс культуры резко повышается; в клетках, содержащих Т-антиген SV40, индуцируется синтез клеточной ДНК, и в короткий срок появляются характерные морфологические и кариологические признаки трансформации. Культуры затем успешно серийно пассировались (Sauer, Defendi, 1966; Koprowski et al., 1966).

Кариологическое изучение инфицированных вирусом SV40 культур человека показало, что инфекция ведет к резкому увеличению числа анеуплоидных клеток. При этом одновременно в клетках увеличивается и число хромосомных aberrаций. Изменение кариотипа не вызвано размножением вируса в клетке; хромосомные нарушения присущи лишь трансформированным клеткам. Появляются они уже спустя два дня после потери клетками контактного торможения деления; последнее, как правило, предшествует кариологическим изменениям. Хромосомный анализ многих трансформированных вирусом SV40 культур клеток человека, проведенный разными авторами, не позволил выделить какой-либо специфичности в изменении кариотипа или избирательности поражений какой-нибудь группы хромосом. Общим для всех культур была лишь та или иная степень хромосомной гетероплоидии (Girardi et al., 1965, 1966; Hayflick, 1967).

Выше мы писали о том, что лимфоидным клеткам крови человека также присущ ограниченный срок жизни *in vitro*. Однако оказалось, что этому правилу подчиняются главным образом лимфоидные клетки эмбриона или маленьких детей, клетки же взрослых людей очень часто дают «спонтанный» выход в «бессмертную» линию без предварительного инфицирования онкогенным вирусом. Это исключение из общего правила оказалось мнимым. Клетки всех изученных «бессмертных» линий из нормальных лимфоидных клеток человека содержали геном вируса Эпштейн—Барр. Заражение клеток происходило в первые годы жизни в результате широкого распространения латентной инфекции этим вирусом в популяции. Эти данные получили прямое подтверждение в получении «бессмертных» линий от лимфоидных клеток «серонегативных» к EBV людей только после инфекции клеток этим вирусом *in vitro* или после естественного инфицирования донора (Miller, 1971). Аналогичные данные имеются для HVS в случае лимфоидных клеток обезьян (Klein, 1972, 1973).

Одна из любимых моделей трансформации *in vitro* — клетки золотистого хомячка, которые, по-видимому, также имеют ограниченную продолжительность жизни *in vitro*. Однако частота «спонтанного» получения из них «бессмертных» линий значительно выше, чем из клеток человека или кур — около 10%. Клетки первичных культур легко трансформируются как РНК-, так и ДНК-содержащими онкогенными вирусами. При этом III стадия роста у трансформированных культур может даже отсутствовать или быть нечетко выраженной, и они легко становятся «бессмертными» линиями (Defendi, 1966).

Результаты кариологического анализа трансформированных вирусом полиомы клеток хомячков (Defendi, Lehman, 1965) можно представить следующим образом: хромосомные аберрации начинают появляться вскоре после морфологической трансформации клеток; эти изменения не столь сильно выражены, как и у вируса SV40, где наблюдается очень быстрая гетероплоидная (в основном — гиперпloidная) трансформация клеток, множество хромосомных аберраций, нестабильность кариотипа. «Полиомные» культуры сохраняют околодиплоидные наборы в течение длительного времени. Можно говорить поэтому лишь о более или менее выраженной атипичности кариотипа в трансформированных вирусом полиомы клетках хомячков. Однако ни в случае вируса полиомы, ни в случае вируса SV40 специфических хромосомных изменений клеток хомячков, характерных для данного вируса, обнаружено не было.

При инфекции аденовирусами широкий спектр хромосомных аберраций в относительно высоком количестве метафазных пластинок наблюдался лишь в инфицированных клетках хомячков, где не происходит образования полного вируса и нет цитопатогенного действия, но индуцируется синтез Т-антигена и происходит трансформация. Инфекция клеток амниона человека, в которых происходит интенсивное размножение вируса с цитопатогенным действием (пермиссивная система), не вызвала значительного увеличения числа хромосомных нарушений.

Длительно пассируемые культуры клеток хомячков, трансформированные *in vitro* различными типами аденовирусов или их гибридов с SV40, также характеризовались теми или иными неспецифическими кариотипическими нарушениями. Однако во всех случаях присутствия в трансформированной клетке генома SV40 степень гетеропloidии и цитогенетических аберраций была выше, чем для разных типов аденовирусов (Stoltz et al., 1967; см. Бломкин, Жданов, 1973).

Гетеропloidная трансформация клеток длительно пассируемых культур характерна для громадного большинства «бессмертных» линий вне зависимости от способа их получения (вирусная, или «спонтанная» трансформация) и является, вероятно, отраже-

нием процесса адаптации культуры к условиям жизни *in vitro* (см. Sanford, 1965, 1967). По-видимому, возможность постройки кариотипа, адекватного условиям *in vitro* (гетероплоидия?), является необходимым условием «бессмертности» *in vitro*. Возможность постройки такого кариотипа зависит, по-видимому, от степени «стабильности» кариотипа данного вида животных в условиях *in vitro*.

Стабильность диплоидного кариотипа клеток в культуре ткани зависит от целого ряда причин (состав питательной среды, видовая принадлежность сыворотки, входящей в питательную среду, способ пассирования и т. д.), в том числе — от видовой принадлежности клеток (см. Sanford, 1965, 1967). В зависимости от видовой принадлежности культур при определенных условиях культивирования и состава питательной среды мы условно можем выделить клетки со стабильным и нестабильным кариотипом. Как правило, клетки со стабильным кариотипом (человек, курица) после ограниченного периода жизни *in vitro* гибнут; они могут избежать гибели, лишь претерпев гетероплоидную трансформацию. Однако спонтанно, без внесения дополнительных стимулов, для культур со стабильным кариотипом это очень и очень редкий случай, и как следствие этого, крайне низкая частота «выхода» их в «бессмертные» линии.

Клетки мышей, в отличие от клеток человека, кариотипически очень нестабильны. Возможно, это и обуславливает легкость гетероплоидной трансформации культур мышей и, как следствие этого, высокую частоту выхода из них «бессмертных» линий.

Присутствие генома вируса SV40 в клетке человека резко усиливает и ускоряет процесс гетероплоидной трансформации культуры, а это, в свою очередь, обеспечивает выживание части клеток в III стадии и переход их в стадию восстановления. С этой точки зрения интересно сравнить описанную выше систему диплоидных эмбриональных фибробластов человека — вирус SV40 с системой диплоидные клетки человека или диплоидные фибробласты легкого эмбриона крупного рогатого скота (они также имеют четко выраженную ограниченную продолжительность жизни *in vitro* — около 70 пассажей) — вирус саркомы Рауса. В двух последних системах морфологически трансформированные клетки с характерной утратой контактного торможения деления не дают начало «бессмертным» линиям. Продолжительность жизни таких трансформированных культур даже короче, чем соответствующих нормальных. При этом в таких трансформированных клетках не удается обнаружить каких-либо отличий кариотипа при сравнении с контрольными. В то же время аналогичные субкультуры клеток крупного рогатого скота, трансформированные *in vitro* вирусом SV40, обнаруживали высокую частоту хромосомных аномалий и гетероплоидии и способность к длительному росту *in*



in vitro (Stenkvist, 1966). В согласии с этими данными и тот факт, что все попытки получить «бессмертные» линии клеток кур, трансформированных вирусом Рауса, оказались безуспешными. При этом в таких трансформированных клетках, способных вызывать опухоли при введении их цыплятам, не было обнаружено каких-либо нарушений кариотипа по сравнению с контролем (Pontén, 1970). В случае культуры диплоидных клеток человека трансформация их in vitro вирусом SV40 приводит, по-видимому, первично к резкому разбалансу их генотипа. Так, опыты с вирусами SV40 и полиомы показывают, что уже самые первые деления инфицированной клетки ведут к полиплоидизации и хромосомным повреждениям. Трансформированные клетки возникают, по-видимому, именно из таких полиплоидных клеток (Lehman, Defendi, 1970). Хираи и др. (Hirai et al., 1974) ссылаются на свои данные о том, что около 50% клеток в монослойной культуре клеток китайского хомячка после первичной инфекции вирусом SV40 становятся полиплоидными. «Генетический гомеостаз» клетки нарушен, и, возможно, в этом случае он становится значительно более пластичным, более приспособляемым. В результате образуется модальный класс, отвечающий условиям in vitro. Почему это не происходит в случае трансформации клетки вирусом Рауса, неясно. Неясно и в какой мере это отражает общие закономерности — описаны «бессмертные культуры», в том числе и трансформированные онкогенными вирусами, сохранившие свои диплоидные или окологиплоидные хромосомные наборы (Sanford, 1965). Правда, в этих случаях не исключены генетические нарушения, не сопровождающиеся видимыми хромосомными изменениями. Создается впечатление, что в случае культур, характеризующихся высокой стабильностью кариотипа, «бессмертную» линию удастся получить лишь в тех случаях, когда трансформация клеток вирусом сопровождается хромосомными аномалиями. Почему одни вирусы могут вызывать нарушения кариотипа, а другие нет, нам остается только предполагать. Во всяком случае, это не связано со свойством «онкогенности» вируса. Такие «банальные» инфекционные вирусы, как вирусы кори, герпеса, краснухи, также могут вызвать хромосомные aberrации и притом в высокой степени (см. Nichols, 1966, 1970). Не удастся ли в таком случае повысить выход «бессмертных» культур от клеток, abortивная инфекция которых «обычными» инфекционными вирусами вызывала бы хромосомные aberrации? В этом отношении интересно сообщение В. Я. Шевлягина и Н. В. Каражас (1970), которым удалось получить перевиваемые культуры эмбриональной ткани человека, трансформированные вирусом Рауса и вирусом полиомы. Однако в этом случае проводилась дополнительная обработка клеток инактивированным вирусом Сендай. Последний, как известно, вызывает

«пульверизацию» хромосом инфицированных клеток (Kato, Sandberg, 1968), и, возможно, это сыграло определенную роль в получении стабильных линий. Так, Секая (Sekya, 1971) не сумел получить перевиваемых линий культур человека при комбинированном действии RSV и метилхолантрена. Следует подчеркнуть, что в таких системах, где «Раусная» трансформация клетки *in vitro* не ведет к «выходу» в стабильную линию, трансформированные клетки тем не менее обладают злокачественными свойствами *in vivo*.

В заключение этого раздела мы хотели бы подчеркнуть следующее: «бессмертность» опухоли — одно из кардинальных ее свойств, причем это не столько свойство самой опухолевой клетки, сколько способность ее становиться «бессмертной» в процессе роста *in vivo* или пассирования *in vitro* и *in vivo*. Как опухолевая клетка обходит «предел» Гайфлика и как связана «бессмертность» с опухолевой трансформацией — четкого ответа на эти вопросы нет, но совершенно очевидно, что проблема «бессмертности» опухолевой клетки — одна из важнейших для понимания механизма опухолевой трансформации и механизма старения.

---

## Глава пятая      ИНДУКЦИЯ ПОЛНОЙ ФОРМЫ ОНКОГЕННОГО ВИРУСА ИЗ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКИ

Для всех изученных ДНК-содержащих онкогенных вирусов опухолевая клетка должна являться непермиссивной системой для продуктивного цикла вируса, и, следовательно, полный инфекционный вирус не должен обнаруживаться в опухоли *in situ*. Многочисленные экспериментальные данные, полученные на модели вирусов группы Рарова, аденовирусов, вирусов группы герпеса, полностью подтверждают это положение, — как правило, все попытки обнаружить инфекционный вирус в бесклеточных экстрактах опухолей, индуцированных этими вирусами, были безуспешны. Отсутствие инфекционного вируса в «природных» опухолях, индуцированных этими вирусами, может быть связано с тем, что трансформация клетки произошла в результате инфекции ее неполным, дефектным вирусом.

В случае же РНК-содержащих саркомных вирусов: опухолевая клетка природного хозяина — пермиссивная система, и главным образом особенности штамма вируса — является он дефектным или недефектным — определяют вирусологический (продуктивный или непродуктивный) статус опухоли. Клетки неприродного хозяина, как правило, — непермиссивная система для саркомных вирусов.

Отсутствие инфекционного, отделимого от клетки, этиологического агента, сочетается тем не менее с многочисленными доказательствами существования вирусного генома в опухолевой клетке — наличие вирусспецифических вирионных и невирионных антигенов, обнаружение в геноме опухолевой клетки вирусной ДНК или РНК (см. Toozе, 1973). Отсутствие инфекционного вируса в опухолевой ткани всегда было камнем преткновения для вирусной теории рака. Особенно это касается «спонтанных» опухолей неизвестной этиологии, в том числе и опухолей человека.

Объяснить это явление пытались разными причинами: маскировкой или низкой дозой вируса в опухолевой ткани, наличием в ней ингибиторов вирусной репликации и т. д., однако большинство из них оказалось несостоятельными.

Основные вопросы, возникающие при анализе фактов, доказывающих отсутствие инфекционного вируса в опухоли, можно сфор-

мулировать так: действительно ли опухолевая клетка содержит вирус или его геном и в какой форме — полной или неполной, какова его локализация, каков конкретный механизм репрессии полного цикла онтогенеза вируса в опухолевой клетке?

Безусловным и решающим доказательством существования полного генома онкогенного вируса в опухолевой клетке явились опыты по индукции. Речь идет о работах, прямо показавших, что в клетках опухолей, вызванных онкогенными вирусами, или в клетках, трансформированных ими *in vitro*, и полностью на протяжении сотен поколений *in vivo* или *in vitro* утративших способность к синтезу полного инфекционного онкогенного вируса, последний действительно может быть индуцирован.

#### ИНДУКЦИЯ ВИРУСА В ГЕТЕРОКАРИОНАХ

##### *Вирус Рауса*

Приоритет в открытии этого феномена принадлежит чешскому ученому Свободе (Svoboda, 1960). Автор работал со штаммом саркомы крыс — ХС, вызванной вирусом Рауса (штамм Прага). Опухоль пассировалась клетками (но не бесклеточным экстрактом) на молодых крысах, и все прямые попытки обнаружить вирус Рауса в клетках и бесклеточных экстрактах этой опухоли или в ее тканевых культурах были безуспешными. Облучение Х- или УФ-лучами, температурные воздействия, изменения в составе питательной среды, воздействие аналогами нуклеиновых кислот и мутагенами не индуцировали образования вируса в клетках ХС. Электронномикроскопическое исследование также не обнаружило вирусных частиц. Однако когда цельные живые клетки ХС были привиты цыплятам, то у последних на месте прививки образовались типичные саркомы, из которых легко удавалось выделить инфекционный вирус Рауса. Вирус Рауса образовывался и *in vitro* в смешанных культурах клеток ХС с куриными фибробластами. Все эти эксперименты затем были многократно подтверждены. Прямой контакт клеток ХС с клетками кур — необходимая предпосылка образования инфекционного вируса Рауса в этой системе. Способность образовывать вирус клетками ХС не снижалась при длительном культивировании их в среде с противовирусной сывороткой. Индукция была успешной и в клональных сублиниях ХС. Предварительное облучение клеток ХС Х-лучами в дозе 5000—10 000 р не подавляло «индуцибельности» опухолевых клеток при последующем совместном культивировании их с фибробластами кур. Минимальное число клеток ХС, необходимое для индукции опухоли у цыпленка, было равно  $10^3$ — $10^4$  (см. Svoboda, 1968).



Впоследствии индукция *in vivo* или *in vitro* инфекционного вируса Рауса была описана для различных клеток млекопитающих (мышей, крыс, хомячков, крупного рогатого скота, обезьян и человека), трансформированных *in vivo* или *in vitro* недефектными штаммами вируса Рауса (см. Шевлягин, 1973; Svoboda, 1968; Svoboda, Hlozaneck, 1970). Возможно, что именно таким был механизм активации вируса Рауса и в старых опытах Боргеца и Дюран-Рейнальса (Borgesca, Duran-Reinalds, 1952; цит. по Зильберу, 1968): фильтраты опухолей голубей, вызванных вирусом Рауса, не давали опухолей у кур. Однако опухоли у кур образовывались, если им трансплантировали измельченную ткань опухоли голубей; из таких опухолей кур затем выделяли вирус Рауса. Все авторы указывали на два необходимых условия для успешной индукции полного вируса Рауса: 1) наличие цельных живых опухолевых клеток и 2) прямой контакт опухолевой клетки с чувствительной перmissiveй клеткой; для вируса Рауса — фибробласт куриного эмбриона. Свобода высказал предположение, что индукция вируса будет наиболее эффективна или вообще имеет место только при полном слиянии опухолевой и перmissiveй клеток — иными словами, при образовании гетерокариона (Svoboda, 1968).

Открытие гетерокарионирующей способности у инактивированного УФ-лучами или  $\beta$ -пропиолактоном вируса Сендай позволило подтвердить это предположение и резко повысило чувствительность и эффективность индукции для виrogenных клеток млекопитающих. Так, по данным Свободы и Дурмашкина (Svoboda, Dourmashkin, 1969), для виrogenных клеток китайского хомячка, трансформированных штаммом Шмидт-Руппина, применение метода гетерокарионизации примерно в 100 раз увеличило выход инфекционного вируса. При этом была обнаружена высокая степень корреляции между числом образованных гетерокарионов и титром «спасенного» (rescue) вируса Рауса. Оптимальным соотношением числа виrogenных клеток и индикаторных клеток было отношение 1:64. Условия, повышающие гетерокарионизацию, в этой и других сходных системах увеличивали титр «спасенного» вируса Рауса (Шевлягин, 1973; Svoboda, Hlozaneck, 1970). Махала и др. (Machala et al., 1970) проанализировали эту же систему, сочетая иммуофлюоресцентный и ауторадиографический методы. Они показали, что только гетерокарионы виrogenной и перmissiveй клеток образуют антиген вирусной оболочки и инфекционный вирус Рауса. При этом от 40 до 100% таких гетерокарионов образовывали вирус Рауса. Гомокарионы и одноядерные клетки обоих типов были отрицательны на вирусный антиген. Для образования вирусного антигена или инфекционного вируса необходимо было слияние виrogenной и перmissiveй клеток; при замене перmissiveй клетки на неперmissiveую куриную же

клетку в гетерокарионе не происходило образования вирусного антигена или инфекционного вируса (Machala et al., 1970; Vigier, Bataillon, 1971).

Точный механизм «спасения» вируса Рауса из генома виrogenной клетки в гетерокарионе пока неизвестен. Все попытки воспроизвести активацию полного вируса в виrogenных опухолевых клетках млекопитающих вирусом-«помощником» были неудачны. Не исключено, что сам механизм образования и созревания вируса Рауса требует участия клеточной мембраны и именно «пермиссивной». Ведь во всех тех немногих случаях, когда были получены вируспродуцирующие «Раусные» опухоли млекопитающих, обнаруживалось значительное изменение биологических свойств вируса, а титр его был крайне низок (Altaner, Svec, 1966).

Индукция полного вируса в образовавшемся гетерокарионе происходит поразительно быстро — в течение 2—3 час. (Обух и др., 1973). Отсюда следует, что «блок» синтеза или созревания вируса или его компонентов в виrogenной клетке происходит на самых поздних этапах онтогенеза вируса.

Подавление способности к делению пермиссивных клеток кур митомидином С или X-лучами не подавляло их способность к индукции вируса в гетерокарионе (Coffin, 1972). В этом отношении интересно, что эритроцит — клетка, утратившая способность к делению в результате процесса нормальной дифференцировки, сохраняя способность быть пермиссивной клеткой (Coffin, 1972). Сам процесс индукции вируса в гетерокарионе не требовал синтеза ДНК, но подавлялся актиномицином Д или ингибиторами синтеза белков (Vigier, 1973). Из этого следует, что в виrogenных клетках млекопитающих экспрессия вирусного генома частично блокирована и не считывается или считывается в значительно меньшей степени, чем в пермиссивной клетке (см. главу 7).

Описаны культуры клеток млекопитающих, трансформированные недефектными штаммами вируса Рауса, в которых методом гетерокарионов не удается активировать инфекционный вирус. Причина этого неизвестна, однако Вижье и Бэтайллон (Vigier, Bataillon, 1971) показали, что методом гетерокарионов «спасти» вирус Рауса из трансформированных клеток млекопитающих можно лишь в том случае, если они синтезируют gs-антиген вирусов лейкоза кур. При этом количество продуцирующих вирус гетерокарионов зависело от количества gs-антигена в культуре виrogenных клеток. В этом случае количество продуцирующих вирус клеток в ряде линий можно повысить предварительной обработкой клеток BudR. Из gs-отрицательных клеток «освободить» вирус Рауса методом искусственных гетерокарионов не удавалось, даже с предварительной обработкой BudR (Donner et al., 1974).

*Вирус SV40*

В 1963 г. Гербер (Gerber, 1963), применив тот же метод, что и Свобода со своими коллегами, получил индукцию полного вируса в смешанной культуре почек зеленой мартышки и безвирусной эпендимомы золотистых хомячков, вызванной вирусом SV40. С другой опухолью, вызванной вирусом SV40, аналогичные результаты получили Сэйбин и Кох (Sabin, Koch, 1963). Как и в случае XC, облучение опухолевых клеток X-лучами (даже в дозе 10 000 p) не снижало их способности к индукции. Не менее  $10^4$  опухолевых клеток требовалось для «выхода» определяемых количеств инфекционного вируса SV40 в смешанных культурах. Гербер (Gerber, 1966) представил фотографии, на которых видно, что специфические цитопатогенные изменения в клетках почек зеленых мартышек наблюдались только там, где они непосредственно соприкасались с опухолевыми клетками. Подавление жизнеспособности опухолевых клеток любым способом (УФ, нагреванием при 56°, ультразвуком) подавляло способность индуцировать в них вирус SV40. Подавление в опухолевой клетке синтеза ДНК цитозинарабинозидом не снижало их «индуцибельной» способности (Gerber, 1966). Как и в случае вируса Рауса, индукция полного вируса SV40 в опухолевой клетке требовала соблюдения двух условий: 1) живых цельных опухолевых и перmissive клеток (для SV40 — клетки почек зеленых мартышек) и 2) прямого контакта этих двух видов клеток.

Блэк (Black, 1966) при изучении клеток хомячков, трансформированных вирусом SV40, показал, что имеются как «индуцибельные» линии, т. е. такие линии, практически во всех клетках которых удается индукция вируса, и линии, в которых индукцию в смешанной культуре получить не удается. Оба таких варианта клеток не различались по характеру роста, онкогенности и наличию вирусспецифических антигенов.

Гербер (Gerber, 1966), который первым использовал вирус Сендай для индукции вируса в гетерокарионах, впервые на модели вируса SV40 показал при этом резкое повышение частоты индукции. Впоследствии метод гетерокарионизации опухолевой и индикаторной клеток вирусом Сендай стал основным методом для изучения индукции вируса SV40. Было показано, что клетки, трансформированные вирусом SV40, можно разделить на три типа: 1) клетки, в которых индукцию вируса можно получить при простом культивировании опухолевых и перmissive клеток; 2) клетки, в которых индукцию вируса можно получить лишь методом искусственной гетерокарионизации и 3) клетки, в которых индукцию не удастся воспроизвести ни одним из двух указанных способов (Knowles et al., 1969; Korowski, 1971).

Как и в случае вируса Рауса, с повышением числа гетеро-

карионов повышался «урожай» вируса, однако не более 1—10% гетерокарионов образовали инфекционный вирус SV40 даже в клопированных клеточных популяциях. Обработка опухолевых клеток BudR и 8-азагуанином до гетерокарионизации повышала количество продуцирующих гетерокарионов до 80—90% (Watkins, 1970). Создается впечатление, что факторы, способствующие разрывам молекулы ДНК, могут повышать частоту индукции.

Образование ядерного гибрида не является необходимым условием индукции. Индукция происходила и при слиянии только цитоплазмы опухолевой и перmissive клетки (Koprowski, 1971). При этом наличие ядра индикаторной клетки не являлось необходимым условием индукции вируса (Croce, Koprowski, 1973).

Образование вируса SV40 (первичная индукция) в гетерокарионе происходит первоначально именно в ядре опухолевой клетки, причем время появления инфекционного вируса (40 час. после слияния) или синтеза вирусной ДНК (19 час. после слияния) примерно равно срокам синтеза вируса и его компонентов в чувствительной клетке при первичной инфекции (Wever et al., 1970). Отсюда следует, что репрессия полного цикла вируса SV40 в опухолевой клетке происходит, очевидно, на очень «ранних» этапах инфекции (в отличие от виrogenных клеток млекопитающих в «Раусной» системе), а факторы дерепрессии локализованы в цитоплазме индикаторной (перmissive) клетки.

Индуцированный из опухолевых клеток вирус SV40, как правило, идентичен вызвавшему трансформацию, однако Тодаро и Такемото (Todaro, Takemoto, 1969) описали повышение трансформирующей способности у такого вируса по сравнению с исходным.

Индукция обычно бывает успешной лишь в опухолевых клетках животных, вид которых неперmissive для полного цикла размножения вируса SV40 (мышь, хомячок). При этом степень и частота индукции зависят от множественности инфекции. Из неперmissive трансформированных клеток вирус SV40 мог быть «спасен» лишь в том случае, если трансформация воспроизводилась полным интактным вирусом. Если же клетки были трансформированы вирусом, облученным УФ, или дефектными частицами, индукцию в гетерокарионах получить не удавалось (Kit, Brown, 1969; Kit et al., 1971).

В перmissive клетках, трансформированных вирусом SV40, индукция даже в условиях искусственной гетерокарионизации, как правило, была безуспешной. По-видимому, в перmissive системе трансформация осуществляется главным образом дефектными вирусными частицами, неспособными к полному циклу развития и, следовательно, неспособными вызвать цитопатогенный эффект в инфицированной клетке. Однако индукцию вируса в таких системах удалось воспроизвести в тройных гетерокарионах, состоящих из перmissive клетки и клеток двух разных трансфор-



мированных перmissive линий, каждая из которых в гетерокарионе с нормальной перmissive клеткой не выделяла вируса (Knowles et al., 1969).

Индукцию вируса удалось воспроизвести в гетерокарионах, состоящих только из трансформированных вирусом SV40 клеток, например, трансформированные клетки мышей или хомячков (неперmissive) и трансформированные клетки человека и обезьян (перmissive). При этом индуцировался вирус только из перmissive клеток (Jensen, Koprowski, 1969; Kit et al., 1970). Все эти опыты показывают, что по крайней мере в трансформированных SV40 перmissive опухолевых клетках содержится полный геном SV40, и что отсутствие продукции вируса самими трансформированными клетками скорее всего не связано с наличием какого-то репрессора и обусловлено отсутствием фактора (ов), необходимого для созревания вируса.

О возможности индукции вируса SV40 (или по крайней мере инфекционной вирусной ДНК) в трансформированных перmissive клетках бесклеточными экстрактами перmissive нормальных клеток сообщалось ранее (Suarez et al., 1972). Правда, при этом отмечалась крайне низкая степень индукции. Фактор, ответственный за индукцию инфекционного вируса, был нечувствителен в ДНК-азе и РНК-азе, но разрушался прогреванием при 56° и обработкой экстрактов протеолитическими ферментами. Он локализовался главным образом в ядерной фракции перmissive клеток. Удаление нуклеиновых кислот из таких экстрактов усиливало их индуцирующую активность. Ядерные экстракты нормальных перmissive клеток индуцирующей способностью не обладали. Активирующий фактор можно было обнаружить и в экстрактах трансформированных перmissive клеток (Lavialle et al., 1974).

Индукцию инфекционного вируса в гетерокарионах не удалось воспроизвести практически для всех изученных линий клеток, трансформированных вирусом полиомы или аденовирусами (Landa et al., 1966; Larson et al., 1966; см. подробно Green, 1970). Интересно, что в клетках 3Т3, трансформированных одновременно двумя вирусами РУ и SV40, удается индуцировать только последний (Watkins, Dulbecco, 1967). Если же клонированные клетки 3Т3 одновременно трансформировать двумя мутантами вируса SV40, то при гетерокарионизации их с перmissive клетками можно получить одновременную индукцию обоих мутантов вируса (см. Kit et al., 1971).

Важно отметить, что, хотя в гетерокарионах клеток, трансформированных аденовирусом типа 12, и перmissive линии клеток Нер-2, не происходила синтеза вируса, сами гетерокарионы, в отличие от трансформированных клеток, были чувствительны к реинфекции гомологичным вирусом (Weber, 1974).

Заканчивая этот раздел, следует еще раз подчеркнуть значение полученных данных. Они однозначно показывают, что геном столь различных по своей природе, онтогенезу и механизму трансформирующего действия вирусов, как RSV и SV40, сохраняется в полной форме в течение многих месяцев и лет на протяжении сотен и тысяч генераций в опухолевых клетках. При этом такие клетки не продуцируют инфекционных или даже неинфекционных частиц, а сам геном вируса находится под контролем клеточного генома в интегрированной форме с ДНК хромосом. И тем не менее при определенных условиях начинается транскрипция и трансляция «поздних» вирусных генов, приводящая к индукции полного инфекционного вируса в опухолевой клетке. Несмотря на кажущееся сходство, нам представляется, что механизм индукции при гетерокарионизации вирусов Рауса и SV40 в непермиссивных системах различен. Для вируса SV40 характерен блок при трансформации непермиссивной клетки на очень ранних этапах его синтеза, когда осуществлена лишь малая («ранняя») часть вирусной программы: проникновение, раздевание, интеграция, индукция синтеза клеточной ДНК, T-, TSTA-антигенов. Как было сказано выше, механизм блока не ясен; наиболее вероятно, что это связано с отсутствием в непермиссивной клетке какого-то клеточного фактора, необходимого для созревания вируса SV40, присутствующего в пермиссивной клетке (или гетерокарионе пермиссивной и непермиссивной клеток). По-видимому, можно говорить о доминировании «пермиссивности» в гетерокарионе. Аналогичные данные о доминирующей роли пермиссивности получены и в опытах по изучению чувствительности соматических гибридов (одноядерных) пермиссивных и непермиссивных клеток к инфекции их вирусами РУ и SV40 (см. Green et al., 1971). Клеточный гибрид хомячка и мыши чувствителен к вирусу РУ, обезьяны и мыши — к вирусу SV40, человека и хомячка — к аденовирусу. Степень чувствительности гибридных клеток к вирусу полиомы зависит от соотношения хромосом в ядрах гибридных клеток мышей и хомячков. Более того, гибриды клеток хомячков (непермиссивных), трансформированных вирусом полиомы, и клеток мышей (пермиссивных) были чувствительны к полиомной инфекции (Basilico, Wang, 1971).

Следует отметить, что феноменология индукции синтеза вируса SV40 в гетерокарионе разительно напоминает процессы активации ядер эритроцитов кур в гетерокарионах клеток HeLa — эритроциты кур, детально изученных первооткрывателем метода гетерокарионизации клеток вирусом Сендай Харрисом (1973; стр. 136).

Данные, полученные на этой модели, Харрис обобщил следующим образом: «Регуляция синтеза нуклеиновых кислот происходит всегда только таким образом, что при слиянии клетки,

способной к синтезу какой-либо нуклеиновой кислоты, с клеткой, не синтезирующей этой кислоты, активная клетка вызывает такой же синтез у инертного партнера. Инертная клетка никогда не подавляет синтез у активного партнера, даже в гетерокарионах, образованных множеством инертных клеток с одной активной. И далее ... можно сказать, что синтез ДНК и РНК в гибриде находится под позитивным контролем».

Механизм блока онтогенеза вируса Рауса, по-видимому, связан с отсутствием каких-либо факторов поверхностной мембраны пермиссивной клетки, необходимых для сборки или созревания полных вирионов.

Совершенно непонятно, почему индукция вируса в гетерокарионе, с такой легкостью происходящая в случае вируса SV40, полностью отсутствует в случае вируса РУ, «соседа» SV40 по одной группе. Тот же вопрос относится и к аденовирусам. Однако имеющийся материал позволяет утверждать, что в случае аденовирусов трансформированные или опухолевые клетки содержат лишь фрагменты генома аденовируса (но не весь геном) (см. ниже). Следовательно, в этих системах нельзя ожидать, чтобы в двойном гетерокарионе произошла индукция полного вируса. Не исключено, что и в случае вируса РУ в геноме опухолевой клетки содержатся лишь фрагменты вирусного генома или дефектный вирусный геном. По крайней мере в случае вируса SV40 в «неиндуцибельных» трансформированных клетках как непермиссивных, так и пермиссивных был индуцирован дефектный вирус SV40, неспособный давать характерный для этого вируса цитопатогенный эффект (Huebner et al., 1974). Такой дефектный вирус SV40, индуцированный в пермиссивных или полупермиссивных клетках, обладал резко сниженной и ограниченной способностью к репликации и к синтезу вирусных антигенов даже в пермиссивных клетках. ДНК из клеток, содержащих дефектный вирус SV40, была не инфекционна (Huebner et al., 1975).

Не исключено также, что в «неиндуцибельных» системах (включая и вирус РУ) геном вируса находится в геноме опухолевой клетки в полной форме, однако в таких системах нарушен или отсутствует механизм «вырезания» вирусного генома, необходимый для индукции синтеза полного вируса.

#### *Вирусы группы герпеса*

В тканях опухолей, индуцированных вирусами Люке, HVS, вирусом болезни Марек и лимфомы Бэркита отделимый от клеток инфекционный вирус обнаружить не удастся; как правило, в таких опухолях не удастся обнаружить и вирусных (вирионных) антигенов (см. Klein, 1972, 1973). Однако кокультивирование клеток лимфомы обезьян, вызванной HVS, с нелимфоидными клет-

ками разных видов обезьян (такие клетки чувствительны к цитопатогенному действию вируса) ведет к выделению вируса и продуктивной инфекции. Простое культивирование опухолевых клеток *in vitro* в течение 24 час. ведет к индукции в них вирусных антигенов, но не вируса. Аналогичные данные были получены для клеток ЛБ и лимфомы морских свинок (см. Klein, 1972, 1973).

Длительное культивирование *in vitro* клеток ЛБ приводит к появлению в популяции опухолевых клеток небольшого числа продуктивно инфицированных гибнущих клеток. Однако в большинстве линий *in vitro* идет синтез только некоторых вирусных антигенов (см. Klein, 1973).

Для вируса Эпштейн — Барр еще не найдены перmissive клетки, и все попытки получить индукцию вируса в клетках ЛБ в гетерокарионе или кокультивированием оказались пока неудачными. Сероэпидемиологические данные позволяют предположить, что клетки одонтогенного эпителия как раз и являются той перmissive системой для EBV, в которой будет идти продуктивная инфекция. Во всяком случае, об этом может свидетельствовать постоянное обнаружение инфекционного вируса EB в смывах носоглотки здоровых людей.

Надо сказать, что для всех онкогенных вирусов группы герпеса лимфоидные клетки природного хозяина являются перmissive системой. Каков механизм блока синтеза вируса в них при опухолевой трансформации, мы не знаем, но очевидно, что в большинстве случаев в клетке присутствует полный вирусный геном. Одно из подтверждений этому — возможность индукции патологического процесса или трансформации клеток опухолевыми клетками лимфомы Баркитта, лимфомы обезьян Saimiri или клетками лимфомы Марека, облученными высокими дозами X-лучей (Klein, 1972, 1973). О виrogenном статусе аденокарциномы Люке, связанном с температурой, мы писали выше.

#### ИНДУКЦИЯ ВИРУСА КАНЦЕРОГЕНАМИ И МУТАГЕНАМИ

##### *ДНК-содержащие вирусы*

Возможность индукции в трансформированной клетке синтеза полного вируса без внесения дополнительного клеточного фактора, как это имеет место в случае кокультивирования или гетерокарионизации, впервые была показана на модели вируса SV40 Гербером (Gerber, 1964). Ему удалось индуцировать митомицином С вирус SV40 в клетках эпидимомы хомячков, вызванной этим вирусом. Впоследствии эти данные были воспроизведены на клонах, полученных из культур почек хомячков, трансформированных



вирусом SV40 *in vitro*. В то же время имеется большое количество работ, в которых не удавалось в аналогичных системах индуцировать вирус SV40 непосредственно в опухолевых клетках различными мутагенами и аналогами оснований нуклеиновых кислот.

В той же системе (но не в любых других), где воспроизводилась индукция SV40 митомицином С, вирус удалось непосредственно индуцировать аналогами оснований нуклеиновых кислот, УФ- и X-лучами. Способность опухолевых клеток к прямой индукции в них вируса SV40 сохраняется и в клональных линиях таких клеток (см. Black, 1968).

Следует еще раз подчеркнуть, что прямая индукция вируса SV40 была получена только с крайне ограниченным набором клеточных линий, причем только хомячков (непермиссивных или более правильно полупермиссивных), а «урожай» вируса при этом был крайне низок. Интересно, что во всех этих линиях вирус можно было индуцировать просто кокультивированием с пермиссивными клетками.

Все попытки получить индукцию инфекционного вируса в опухолях, вызванных *in vivo* или *in vitro* РУ или аденовирусами, самыми разными индукторами оказались отрицательными (см. Tooze, 1973). Лишь Фогель и Закс (Fogel, Sachs, 1967, 1970) описали необычную систему, в которой удалось получить индукцию РУ в трансформированных, непермиссивных клетках крыс. Около 0,01% клеток этой линии спонтанно выделяли вирус; способность клеток спонтанно образовывать вирус полиомы передавалась наследственно. Митомицин С, УФ-, X-лучи и гетерокарнизация повышали в 500 раз «урожай» вируса, и около 40% клеток начинали синтезировать вирус полиомы.

РНК: ДНК гибридационный анализ этой линии показал, что вирусная ДНК, так же как и в других системах, ассоциирована с хромосомальной ДНК в количестве 6—9 геномных эквивалентов вируса на клетку (Fogel, Sachs, 1973). Однако это количество составляло примерно лишь 20% количества всей вирусной ДНК (около 20 геномов), обнаруживаемой в клетках. Таким образом, значительная часть клеток содержала ДНК вируса как в интегрированной, так и в свободной (внехромосомной) форме. Хотя синтез вирусной ДНК в этих клетках и имел место, синтеза вирусного белка и полного вируса в большинстве клеток этой линии не происходило.

Основным отличием системы, описанной Фогелем и Заксом, от всех других «полиомных» систем является образование в опухолевых клетках свободной внехромосомной вирусной ДНК. Интересно, что Уоткинс (Watkins, 1974) недавно показал, что в клетках кролика, трансформированных вирусом SV40, имеет место такая же ситуация. Так как BudR и другие аналоги синтеза ДНК

могут иметь двойной механизм действия: один связанный с однонитчатыми разрывами молекулы ДНК и другой, опосредованный подавлением синтеза репрессора, то не исключено, что в трансформированных клетках крыс, описанных Фогелем и Заксом, синтезируется фактор, блокирующий образование вирусспецифического белка, необходимого для синтеза полного вириона. BudR блокирует его синтез, индуцируя таким образом полный инфекционный вирус полиомы.

Особый случай представляет индукция полного вируса в клетках, трансформированных ts-A-мутантом РУ. В этом случае при переносе клеток в пермиссивную температуру в них активировался синтез вирусной ДНК и полного вируса (Vogt, 1970; Folk, 1973). Возможно, это связано с «деинтеграцией» вирусного генома с геномом клетки при непермиссивной температуре.

В 1972 г. были получены данные об индукции BudR или культивированием в среде без аргинина в безвирусных клетках лимфомы Бэркитта вируса EB (см. Gerber, 1972; Hamprag et al., 1972) — предполагаемого этиологического агента этого заболевания. Некоторые компоненты EBV (ранний антиген) могут индуцироваться в клетках и в присутствии BudR, т. е. для их образования не нужен синтез вирусной ДНК. Капсидные и мембранные же антигены вируса синтезировались только после индукции синтеза вирусной ДНК (при удалении из среды BudR). Синтез вирусной ДНК при индукции вируса в этой системе имел два различных по времени пика — ранний и поздний. Не исключено, что первый пик индукции синтеза вирусной ДНК имеет место, когда геном вируса еще «ассоциирован» с клеточным геномом. Механизм активации EBV BudR требует включения его в ДНК именно в ранний и короткий период S-фазы клеточного цикла (S-1), который является критическим для процесса индукции. Эти данные дают основание предполагать наличие в ДНК клетки «уникальных» последовательностей, контролирующих активацию репрессированного генома EBV (см. Hamprag et al., 1973). Хэмпери и др. (Hamprag et al., 1974b) показали, что именно в период S-1 начинается репликация ДНК EBV при индукции. Авторы предполагают, что начало синтеза «локализуется» в месте ассоциации генома вируса EB с геномом клетки. Инкорпорация BudR происходит как в ДНК клетки, так и вируса, однако неясно, является ли этот процесс необходимым для индукции. Для активации синтеза EBV достаточно очень короткого периода воздействия аналога на клетку (Hamprag et al., 1974c).

#### *РНК-содержащие вирусы*

Несмотря на отдельные положительные результаты, опыты по «прямой» индукции ДНК-содержащих онкогенных вирусов в опухолевых клетках различными мутагенами или канцерогенами

были, как правило, отрицательны. Совсем иные данные получены при изучении прямой индукции РНК-содержащих онкогенных вирусов. В непродуцирующих вирус клетках мышей и крыс, трансформированных MSV (Aarons, 1971), BudR, IudR индуцировали вирус саркомы, причем, по-видимому, индукция была «двухступенчатой». Сначала в таких клетках индуцировался латентный лейкозный вирус, обладающий свойствами вируса-«помощника», и последний уже активировал геном саркоматозного вируса MSV (см. Tooze, 1973). Солитарная индукция лейкозного вируса из нормальных клеток мышей высоколейкозных линий AKR и C58 как «массовых» культур, так и клональных линий была получена при использовании УФ, X-лучей и даже при инфекции клеток вирусом SV40 (Lowy et al., 1971; Teich et al., 1973). Активация полного лейкозного вируса крайне редкий процесс, затрагивающий около 0,1—0,5% клеток клональной популяции; в несколько большем количестве клеток (2—5%) происходит в этом случае индукция вирусного антигена (см. Rowe, 1973).

Механизм индукции онкорнавирусов аналогами тимидина изучен сравнительно мало. Активация требовала включения BudR в ДНК, так как эквивалентные концентрации тимидина подавляли индукцию, а УФ и X-лучи усиливали этот процесс. Облучение видимым светом также усиливало процесс индукции, вызванной BudR (см. главу 8).

При подавлении синтеза ДНК цитозинарабинозидом и бессывороточной средой эффективность активации резко снижалась (Teich et al., 1973).

Возможность активации химическими канцерогенами или мутагенами саркомных вирусов из трансформированных или опухолевых клеток, сравнительно легко воспроизводимой в клетках природного хозяина или близких видов, была показана и в гетерологических опухолевых клетках. Однако в этом случае эффективность индукции была значительно ниже и воспроизводилась с меньшей частотой. После долгих неудачных попыток индуцировать вирус Рауса в опухолевых или трансформированных клетках млекопитающих Алтанерова и Алтанер (Altanerova, Altaner, 1972) индуцировали вирус недефектного штамма RSV в клетках хомячков 5-азацитозином, но индуцированный вирус не был идентичен исходному (мутант, возникший при обработке интегрированного ДНК-провируса мутагеном?).

Химическими или физическими агентами не удалось индуцировать MSV в «безвирусных» клетках морских свинок (Rhim et al., 1973a) или амниона человека, трансформированных MSV-Ki (Parageorge et al., 1974). Однако в обоих случаях геном MSV мог быть освобожден из таких клеток суперинфекцией их вирусами-«помощниками», для которых эти клетки были перmissive системой (RD-114, например). Трансформирующий вирус мог быть

индуцирован BudR из клеток крупного рогатого скота, трансформированных FeSV. Однако при этом индуцированный вирус утрачивал инфекционность для клеток кошек, но приобретал тропность к клеткам коровы и человека (Chan et al., 1974). Нельзя в этом случае объяснить утрату способности индуцированного вируса FeSV к размножению в клетках кошек приобретением им тропности к клеткам крупного рогатого скота. Нельзя по той причине, что исходный FeSV так же хорошо размножался в клетках кошек, коров и человека. Изменение спектра чувствительных клеток индуцированного FeSV не меняло его антигенности в реакции нейтрализации. Эти данные говорят о том, что и в гетерологичных клетках индукция саркомного вируса, по всей вероятности, двухэтапный процесс, первым этапом которого является активация эндогенного вируса (см. главу 8). Если активированный эндогенный вирус способен дать фенотипическое смешивание с интегрированным в клетке саркомным вирусом или образовать с ним истинный гибрид, то тогда обработка мутагеном может привести к индукции саркомного вируса (соответствующего псевдотипа, отличного от исходного). Необходимым условием в этом случае является предварительная индукция эндогенного вируса. В случае невозможности такого процесса или при «некомплементарности» эндогенного и саркомного вируса обработка мутагенами дает отрицательный результат индукции. Во всяком случае, этот процесс весьма сходен с процессом «спасения» саркомного вируса лейкозным вирусом-«помощником», с той только разницей, что вирус-«помощник» в этом случае имеет не экзогенное, а эндогенное происхождение. Все остальные этапы взаимодействия двух вирусов, по-видимому, идентичны.

Материал об активации эндогенных вирусов различными химическими и физическими агентами, приведен нами более подробно в главе 8. Здесь же мы отметим только, что данные об индукции MSV в трансформированных им гомологичных или гетерологичных клетках показывают, что саркомный геном в полной форме сохраняется в безвирусных клетках и может быть индуцирован в них различными воздействиями. Нет никаких оснований предполагать, что для других саркомных вирусов млекопитающих имеются принципиальные отличия в характере взаимодействия генома вируса с опухолевой клеткой.



---

Глава шестая ГЕНЕТИЧЕСКАЯ  
ИНФОРМАЦИЯ  
ОНКОГЕННЫХ  
ДНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ  
В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

ИНТЕГРАЦИЯ ГЕНОМА  
ДНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ  
С ГЕНОМОМ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКИ

Одним из основных постулатов вирусно-генетической теории происхождения опухолей является интеграция генома онкогенного вируса в геном опухолевой клетки.

Возможность индукции биологически активного вируса из трансформированных не продуцирующих инфекционный вирус клеток еще не является доказательством интеграции вирусной нуклеиновой кислоты в геном клетки хозяина. Столь же правомерным могло быть и предположение о том, что вирус персистирует в неинфекционной форме или существует в форме эписомы и затем активируется под воздействием различных факторов. Достоверным доказательством интеграции явились прямые опыты по обнаружению вирусного генома в геноме трансформированной клетки.

Вероятно, существует несколько методических подходов к изучению процессов интеграции вирусных и клеточных нуклеиновых кислот. С молекулярно-биологических позиций наиболее точное доказательство — гибридизация между клеточной ДНК и вирусной ДНК и РНК. Казалось бы, наиболее простой путь заключается в этом случае в получении меченого препарата вирусной ДНК с последующей гибридизацией этой ДНК с ДНК нормальных и трансформированных клеток. Однако этот метод оказался сравнительно малоприменимым: во-первых, из-за чисто технических трудностей получения высоко меченой вирусной ДНК, во-вторых, из-за незначительных размеров вирусной ДНК по сравнению с клеточной и, в-третьих, вследствие незначительного количества копий вирусного генома в трансформированных клетках. И первые доказательства интеграции вирусной ДНК в состав клеточного генома (Axelrod et al., 1964; Winocour, 1965), а также ряд других (см. Weil et al., 1967; Aloni et al., 1969) были получены именно с использованием метода гибридизации меченой вирусной ДНК с клеточной ДНК. Результаты этих работ в настоящее время

трактуемые неоднозначно вследствие указанных выше причин, свидетельствовали о том, что ДНК вируса ассоциирована с геномом опухолевых клеток. Одновременно было показано, что вирусный геном отсутствует в митохондриальной ДНК нормальных и трансформированных клеток (Benjamin, 1968).

Принципиально иной подход к решению этой проблемы был продемонстрирован Вестфалем и Дальбекко (Westphal, Dulbecco, 1968). Вначале авторы выделили из очищенного вируса полиомы компонент I вирусной ДНК, обладающий суперспиральной двунитевой циркулярной конфигурацией (Dulbecco, 1968). Из-за своей особой структуры с помощью ряда методик этот компонент ДНК удается получить в абсолютно чистом виде, свободном от какой бы то ни было примеси клеточных ДНК. Компонент I ДНК вируса полиомы использовали для синтеза *in vitro* вирусспецифической РНК с помощью РНК-полимеразы *E. coli*. Полученный высокоочищенный препарат РНК, полностью комплементарный вирусной ДНК, использовали для гибридизации с ДНК из нормальных или трансформированных клеток. Немеченую денатурированную клеточную ДНК иммобилизовали на нитроцеллюлозные фильтры и инкубировали их в растворе вирусспецифической меченой РНК. Такие фильтры затем обрабатывали РНК-азой в средах высокой ионной силы, т. е. в условиях, когда гибриды ДНК:РНК стабильны к действию этого фермента (Gillespie, Spiegelman, 1965). Наличие метки на фильтре после такой обработки свидетельствовало о том, что в составе клеточной ДНК имеются последовательности, комплементарные вирусспецифической РНК.

Указанным способом действительно удалось показать, что клетки, трансформированные вирусом полиомы или вирусом SV40, содержат в составе ядерной ДНК нуклеотидные последовательности, способные гибридизоваться с вирусспецифической РНК (Dulbecco, 1968; Sambrook et al., 1968).

В зависимости от типа клеток в них было обнаружено от 5 до 60 геномных эквивалентов вируса полиомы (Westphal, Dulbecco, 1968).

Эта работа послужила началом серии многочисленных работ, где с достаточной убедительностью было показано, что в случае инфекции как вирусом полиомы, так и вирусом SV40, приводящей к трансформации клеток, имеет место интеграция вирусной ДНК в ядерную ДНК опухолевых или трансформированных клеток (Tai, O'Brien, 1969; см. Winocour, 1971; Babiuk, Hudson, 1972).

В зависимости от типа клеток интеграция может иметь место на разных сроках инфекции. Так, в клетках 3Т3, зараженных вирусом SV40, интеграция происходит через 48 час. При этом обнаружено, что синтез клеточной ДНК не является необходи-

мым для акта интеграции, но увеличивает количество интегрированной вирусной ДНК (Collins, Sauer, 1972).

В то же время в хомячковых клетках, зараженных тем же вирусом, интегрированная вирусная ДНК обнаруживается уже на 15—20-й час инфекции, что совпадает по времени с индукцией синтеза клеточной ДНК и вирусного Т-антигена (Hirai et al., 1974).

При исследовании локализации и физического состояния ДНК в трансформированных клетках обнаружено, что вирусная ДНК находится в ядре клеток, где она связана с хромосомами. В отличие от вириона вирусная ДНК в составе хромосом находится в форме линейных двуниевых молекул. Такую интегрированную с хромосомами ДНК не удается отделить от клеточной с помощью щелочной денатурации, что предполагает существование ковалентной связи между ними (Dulbecco, 1968).

В ряде исследованных систем трансформированных клеток с помощью метода гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах были получены данные, свидетельствующие о том, что некоторые трансформированные клетки могут содержать до 1000 вирусных геномов SV40 (см. Berg, 1974).

Однако, как выяснилось впоследствии, метод гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах оказался не абсолютно корректным методом (Naas et al., 1972). При его использовании часть истинных гибридов ДНК:РНК на фильтре не задерживалась, а кроме того, задерживались неполностью комплементарные гибридные молекулы, и, как следствие этого, общее расчетное количество вирусных геномов, способных к действительной гибридизации с вирусной ДНК, оказалось завышенным (Naas et al., 1972).

Более точные данные получены с использованием метода кинетики реассоциации, предложенного Бриттен и Коне (Britten, Kohne, 1968). Именно с помощью этого метода Гелб и др. (Gelb et al., 1971a) показали, что на самом деле клетка содержит, как правило, лишь 1—5 эквивалентов вирусного генома. Таким образом, было подтверждено ковалентное связывание вирусной и клеточной ДНК и уточнено истинное количество вирусного генетического материала в трансформированных клетках.

Метод кинетики реассоциации позволил не только определить точное количество геномов вируса в трансформированной клетке, но и выявить их ассоциацию с определенными нуклеотидными последовательностями в ДНК.

Дело в том, что указанный метод основан на медленной ренатурации (реассоциации) денатурированных двуниевых ДНК, имеющих сравнительно низкий молекулярный вес ( $5 \cdot 10^5$ — $5 \cdot 10^6$  дальтон). Как правило, кинетика реассоциации таких фрагментов ДНК носит двухфазный характер. Это обусловлено тем, что в составе генома имеются два основных типа нуклеотидных после-

довательностей — повторяющиеся и уникальные. Существование часто повторяющихся последовательностей обуславливает «быструю», а уникальных — «медленную» реассоциацию. Уникальные последовательности, по-видимому, являются структурными генами, а природа повторяющихся последовательностей остается неясной.

Гелб и Мартин (Gelb, Martin, 1973) показали, что во всех исследованных линиях клеток, трансформированных вирусом SV40, происходит ассоциация вирусной ДНК в основном с уникальными нуклеотидными последовательностями клеточной ДНК. Кроме того, на основании этих данных был сделан вывод, что в различных клетках интеграция ДНК может иметь место в различных участках генома, но приуроченных к уникальным последовательностям.

Не менее важен вопрос о специфичности ассоциации вирусного генома с ДНК в составе отдельных хромосом. Работы Вейс (Weiss, 1970) с гибридными клетками (мышь — человек) свидетельствовали о том, что геном вируса SV40 локализован во многих хромосомах. Однако последние работы из лаборатории Копровского (Сросе, Копровский, 1973) дают основание предполагать о преимущественной локализации генома вируса SV40 в С7 хромосоме трансформированных клеток человека.

Все указанные выше данные были получены на модели трансформированных клеток. Резонно было предположить, что трансформация и интеграция тесно связаны между собой, т. е. интеграция геномов обязательно ведет к трансформации. Однако есть данные, ставящие под сомнение такое положение.

Во-первых, морфологические ревертанты трансформированных клеток сохраняют в своем составе вирусный геном (Shani et al., 1972; Smith et al., 1972; см. подробно главу 4).

Во-вторых, в работах Ральфа и Колтера (Ralph, Colter, 1972), Хираи и Дефенди (Hirai, Defendi, 1972) показано, что интеграция геномов может происходить и при литической инфекции, т. е. в клетках, где отсутствует трансформация и происходит продукция инфекционного вируса. Об этом имеется подробное сообщение в работе Валдек и др. (Waldeck et al., 1973), которые показали, что при литической инфекции клеток CV-1 вирусом SV40 вирусспецифическая ДНК выявляется как в ассоциации с высокомолекулярной ядерной ДНК, так и с низкомолекулярной ДНК. Размер такой клеточной ДНК не превышал  $6 \cdot 10^6$  дальтон. Интересно, что вирусспецифические последовательности в основном обнаруживались в связи с фракцией низкомолекулярной ДНК, причем эта ДНК не являлась продуктом деградации высокомолекулярной ДНК (см. стр. 113, 114).

Из представленных выше данных следует, что интеграция вирусного генома характерна для данной группы вирусов как



при трансформации, так и в случае литической инфекции. По-видимому, клеточные факторы определяют активность этого генома, т. е. уровень и тип его экспрессии, что в свою очередь и определяет статус зараженной клетки.

Данные для других онкогенных ДНК-содержащих вирусов менее полны. Так, у двух онкогенных ДНК-содержащих аденовирусов типа 12 и 18 показана интеграция их ДНК с геномом трансформированной клетки (Doerfler, 1968; zur Hausen, 1968; zur Hausen, Sokol, 1969; Doerfler, 1969).

В последнее время получены новые данные об интеграции генома различных аденовирусов в геном трансформированной клетки (Doerfler et al., 1974). Так, в случае аденовируса типа 2 исследовано 10 линий трансформированных клеток. В среднем в них обнаруживается 14% вирусного генома в интегрированной форме, причем этот фрагмент генома представлен двумя — шестью копиями. При изучении двух трансформированных линий аденовирусом типа 5 в них выявлено 35—45% вирусного генома в количестве четырех-пяти копий. В случае аденовируса типа 12 также интегрируется 14% генома в виде 15—30 копий (Sambrook et al., 1973, 1974). Интересно также, что трансформацию можно осуществить не только вирусом, но и его ДНК, при этом, как оказалось, нет необходимости использовать интактную молекулу ДНК (мол. вес  $20 \cdot 10^6$  дальтон). Феномен трансформации удалось получить при использовании фрагмента ДНК с молекулярным весом  $0,75 \cdot 10^6$  дальтон, что составляет лишь 5% генома вируса. Этот фрагмент локализован на одном из концов молекулы и обогащен по Г-Ц (Graham et al., 1974).

Особое место занимают онкогенные вирусы группы герпеса. Исследование судьбы вирусной ДНК и процессов ее функционирования для этих вирусов сопряжено с методическими трудностями: 1) низкий титр вируса имеющихся в распоряжении исследователей культур клеток; 2) геном вирусов группы герпеса представлен очень крупной ДНК, размер которой составляет примерно  $100 \cdot 10^6$  дальтон. Тем не менее Нонояма и Пагано (Nonoyama, Pagano, 1971) получили из вируса Эпштейн—Барр нативную ДНК, которую использовали в качестве матрицы для синтеза РНК *in vitro* с РНК полимеразой *E. coli*. Синтезированную РНК, коэффициент седиментации которой был в пределах 12—16S (около  $0,5 \cdot 10^6$  дальтон), гибридизировали с ДНК из различных клеток. Оказалось, что клетки, продуцирующие вирус Эпштейн—Барр, содержат около 700 геномов вируса на клетку. Клоны клеток лимфомы Беркитта, не продуцирующие вируса, содержали 30—60 геномных эквивалентов вируса. При индукции синтеза в таких клетках вируса бромдезоксисуридином количество геномов вируса возрастало в 200 раз. Несколько меньшие значения (шесть геномов на клетку) были получены в работе Цурхаузена и др. (zur Hausen

et al., 1970). Эти данные свидетельствовали о существовании генома вируса Эпштейн—Барр в непродуцирующих вирус клетках, но оставалось неясным, где локализован этот геном.

Ответ на этот вопрос дала работа Нонояма и Пагано (Nonoyama, Pagano, 1972), где было показано, что ДНК, выделенная из непродуцирующих вирус клеток путем их лизиса на поверхности градиента сахарозы и последующего центрифугирования, распадается на два основных пика — 130S и 15—30S. ДНК из различных зон градиента гибридизировали с  $H^3$ -РНК, синтезированной *in vitro* на матрице вирусной ДНК. Оказалось, что эта РНК гибридизируется только с ДНК в зоне градиента 30—70S, т. е. там, где клеточная ДНК отсутствует. С материалом из зоны 15—30S и 130S гибридизации обнаружено не было. Эти данные свидетельствовали, во-первых, о том, что геном вируса в непродуцирующих вирус клетках находится в полной или в почти полной форме, и, во-вторых, что вирусная ДНК не связана ковалентными связями с клеточной ДНК в хромосоме, как это имеет место для вирусов полиомы и SV40.

Джен и др. (Jehn et al., 1972), исследуя судьбу ДНК вируса Эпштейн—Барр в клетках NC37, не продуцирующих вируса, показали, что вирионная ДНК проникает в ядра клеток, при этом она обнаруживается после экстракции в градиенте сахарозы в зоне, соответствующей 59S (молекулярный вес  $100 \cdot 10^6$  дальтон). В то же время ДНК, выделенная из нормальных клеток, имела константу седиментации 73S. Эти данные еще раз подтвердили отсутствие ковалентного связывания клеточной и вирусной ДНК.

В более поздних работах Адамс и др. (Adams et al., 1973) уточнили эти данные, и, как оказалось, использование в экспериментах центрифугирования в щелочном градиенте сахарозы дало одностороннюю информацию. Если использовать для анализа клеточной ДНК центрифугирование в градиенте сахарозы при нейтральных значениях pH, то вирусная ДНК находится в ассоциации с клеточной. На основании этих данных авторы считают, что интеграция геномов при герпетической инфекции может иметь место, но образующаяся между вирусной и клеточной ДНК связь является щелочно-лабильной, т. е. нековалентной. Последние работы с использованием метода кинетики реассоциации подтвердили присутствие генома вируса Эпштейн—Барр в клетках лимфомы Беркитта и назофарингеальной карциномы (Kawai et al., 1973; Wolf et al., 1973; Nonoyama et al., 1973).

По-видимому, полученные в последнее время данные действительно свидетельствуют об отсутствии линейного ковалентно связанного фрагмента ДНК вируса герпеса в составе клеточной ДНК (Tanaka, Nonoyama, 1974).

Таким образом, очевидно, что геном вируса Эпштейн—Барр действительно ассоциирован с хромосомальным материалом. Од-

нако в отличие от мелких ДНК-содержащих вирусов здесь отсутствует ковалентная связь между клеточной и вирусной ДНК. Но тем не менее в ядре клеток присутствует именно полный вирусный геном, поскольку из таких клеток удается активировать вирус путем переноса клеток на среду, обедненную аргинином, или обработкой таких клеток аналогами тимидина (см. главу 5). Существует также предположение, что ДНК вируса герпеса в клетке может существовать не только в связи с ядром, а представлять собой некий внехромосомальный генетический элемент типа плазмиды (Nonoyama, Tanaka, 1973).

И, наконец, в последнее время большой интерес привлекли работы, связанные с обнаружением вируса герпеса типа 2 в тканях рака шейки матки. Молекулярно-биологический аспект этой проблемы был рассмотрен группой Ройзмана (Frenkel et al., 1972; Roizman, Frenkel, 1973). Ими было показано, что клетки рака шейки матки, свободные от инфекционного вируса герпеса типа 2, содержат фрагмент ДНК, составляющий 39% интактной ДНК вируса герпеса. Данные о кинетике реассоциации показали, что в таких клетках содержится от 1 до 3,5 фрагмента. Далее было обнаружено, что вирусные последовательности связаны с часто повторяющимися последовательностями ДНК клеток хозяина. Таким образом, вирус герпеса отличается от вируса Эпштейн—Барр тем, что значительная часть генома вируса герпеса тесно ассоциирована с ДНК, и при этом с часто повторяющимися последовательностями в клеточной ДНК.

Незначительная информация имеется также относительно вируса болезни Марека (Nazerian et al., 1973). В этом случае для гибридизации авторы использовали  $H^3$ -РНК, синтезированную *in vitro* на матрице вирусной ДНК. Во всех опухолях и тканях больных цыплят в составе ДНК были обнаружены нуклеотидные последовательности, способные гибридизироваться с вирусспецифической РНК. Относительное количество геномных эквивалентов колебалось в пределах 3—15 на клетку, причем клетки опухолей содержали большее количество вирусных геномов, чем клетки других органов больных цыплят.

Заканчивая раздел об интеграции ДНК-содержащих вирусов, следует подчеркнуть те трудности, которые возникают при изучении этого процесса на модели крупных ДНК-содержащих вирусов: 1) отсутствие методов для анализа ДНК : ДНК гибридизации при использовании ДНК с молекулярным весом, превышающим  $10 \cdot 10^6$  дальтон: фрагментация высокомолекулярной ДНК может исказить истинную картину гибридизации, 2) использование РНК, синтезированной *in vitro* на матрице вирионной ДНК, также не всегда дает точные результаты, поскольку синтезируемые *in vitro* РНК не представляют собой полной копии генома (или набора молекул, соответствующих полной копии). Вследствие этого так-

же может возникнуть искажение истинной картины интеграции. Тем не менее эти ограничения ни в коей мере не влияют на качественную сторону проблемы, т. е. на доказательства существования вирусного генома в геноме зараженной клетки.

Таким образом, представленные выше данные о ДНК-содержащих вирусах полностью подтвердили основной постулат вирусо-генетической теории об интеграции вирусного и клеточного геномов при опухолевой трансформации клеток.

По-видимому, на первый план в настоящее время выдвигаются три основных вопроса, связанных с интеграцией вирусной ДНК: 1) о специфичности места интеграции, т. е. о локализации точек разрыва клеточной ДНК, необходимых для последующей интеграции вирусного генома; 2) о специфичности разрыва вирусной ДНК, поскольку специфичность разрыва должна в последующем определять спектр синтезируемых вирусспецифических РНК; 3) о существовании в составе вирусного генома генов, ответственных за интеграцию (гены интеграции). Все три вопроса являются достаточно сложными для их экспериментального разрешения. Пожалуй, наибольшие успехи связаны с идентификацией генов интеграции, которые стали возможны после выделения и изучения термочувствительных мутантов вирусов полиоми и SV40. Об этом подробно сказано в главе 4, и полученные данные позволяют предполагать, что в ближайшее время этот ген (или гены) будет локализован на генетической карте вирусов.

Что же касается специфичности мест интеграции в клеточной ДНК, то с методической точки зрения этот вопрос наиболее труден в настоящее время (см. Георгиев, 1970).

#### ТРАНСКРИПЦИЯ ИНТЕГРИРОВАННОГО ВИРУСНОГО ГЕНОМА

Представленные выше данные свидетельствуют о том, что, как правило, геном онкогенного ДНК-содержащего вируса в трансформированных клетках интегрируется с геномом клетки хозяина. Однако сама по себе интеграция недостаточна для перехода клетки в трансформированное состояние. По-видимому, интеграция есть лишь способ закрепления наследственной информации, а для поддержания трансформированного состояния необходима деятельность этого генома, т. е. транскрипция РНК и синтез определенных вирусспецифических белков.

Переходя к вопросу о синтезе вирусспецифических РНК в зараженных ДНК-содержащими вирусами клетках, следует обратить внимание на следующее.

Во-первых, следует разделить синтез РНК на две основные стадии — «ранний» синтез — до начала репликации ДНК и «позд-



ний» синтез — после начала репликации ДНК, т. е. с момента образования дочерних молекул вирусной ДНК.

Во-вторых, говоря о транскрипции РНК, следует также обратить внимание и на размеры синтезируемой РНК, поскольку этот критерий отражает полноту считывания генома и, как следствие этого, способность к кодированию различных вирусспецифических белков.

В-третьих, геном вирусов представлен двунитевой ДНК, поэтому транскрипция может идти либо по симметрическому пути, когда копируются обе нити ДНК, либо по асимметрическому, когда копируется одна из нитей ДНК на данном этапе инфекции.

При изучении свойств РНК, выделенных из клеток, зараженных вирусами группы Рарова, были обнаружены следующие характерные особенности. В клетках, которые были продуктивно заражены этими вирусами, выявляются оба класса вирусспецифической РНК — «ранняя» и «поздняя», причем, как правило, синтез «ранней» РНК продолжается и на поздних стадиях инфекции. По данным Вейнберг и др. (Weinberg et al., 1972), которые исследовали РНК из клеток BSC-1, зараженных вирусом SV40, эта РНК на ранних стадиях инфекции обладала коэффициентом седиментации 19S, а на поздних стадиях, кроме этой РНК, синтезировалась и РНК с коэффициентом седиментации 16S. Последняя имеет молекулярный вес 650 000 дальтон, а РНК с коэффициентом седиментации 19S — 900 000 дальтон. В сумме молекулярный вес синтезируемой РНК составляет по этим данным  $1,55 \cdot 10^6$  дальтон. Поскольку молекулярный вес двунитевой ДНК вируса SV40 —  $3,4 \cdot 10^6$ , то на одну нить приходится  $1,7 \cdot 10^6$ , и, следовательно, можно думать, что при продуктивной инфекции на поздних стадиях имеет место полная транскрипция вирусного генома. Данные подобного рода были получены и в других работах (Azuna et al., 1969; Martin, Byrne, 1970; Petersen et al., 1972; Fried, 1972; Fried, Sokol, 1972; Weinberg et al., 1972b). По-видимому, в зависимости от тех клеток, где происходит репродукция вируса, размер вирусспецифической РНК, синтезируемой на ранних стадиях инфекции, может различаться. Так, Сокол и Карп (Sokol, Carp, 1971), показали, что в клетках AGMK, зараженных вирусом SV40, «ранняя» РНК имеет молекулярный вес  $1,2 \cdot 10^6$  дальтон, а «поздняя» —  $1,7 \cdot 10^6$  дальтон.

По-видимому, иная ситуация имеет место в случае трансформированных клеток. Здесь твердо показано, что происходит синтез только «ранней» РНК (Benjamin, 1966; Aloni et al., 1968; Oda, Dulbecco, 1968a, b). По данным Хадсона (Hudson, 1972), количество вирусспецифической РНК в трансформированных клетках составляет 1—2% от РНК клеток, литически инфицированных этим вирусом.

Интересные данные приводятся в работе Левина и др. (Levin et al., 1969), которые исследовали различные клоны клеток хомячков, трансформированных вирусом SV40. Эти клоны отличались тем, что в них наблюдалась различная экспрессия вирусных функций. Часть клонов была способна к синтезу Т-антигена, другая часть только к синтезу поверхностного S-антигена, третья — к синтезу Т- и S-антигенов. При анализе РНК из клеток различных клонов оказалось, что только те клетки, которые продуцируют Т-антиген, содержат вирусспецифическую «раннюю» РНК. Из этих данных следовало два основных вывода: во-первых, S-антиген не кодируется вирусным геномом, а во-вторых, «ранние» РНК кодируют, по-видимому, синтез функциональных белков типа Т-антигена, а не структурных вирусных белков.

Все представленные выше данные относились к РНК, выделенной из цитоплазмы зараженных клеток. Несколько иная картина наблюдалась для ядерной РНК. Прежде чем перейти к рассмотрению вопроса о ядерной вирусспецифической РНК, вероятно, следует остановиться на некоторых методических вопросах.

Как правило, для выделения вирусспецифической РНК ее обычно гибридизуют после экстракции из зараженных клеток с вирусной ДНК, или, вернее, с суперспиральным компонентом I этой ДНК, иммобилизованной на нитроцеллюлозном фильтре. После гибридизации эту РНК элюируют и анализируют седиментацией в градиенте сахарозы.

Используя именно этот метод, Линдберг и Дарнелл (Lindberg, Darnell, 1970) показали, что ядерная вирусспецифическая РНК имеет молекулярный вес ( $4 \cdot 10^6$  дальтон), более чем вдвое превышающий вес вирусного генома. Впоследствии эти данные полностью подтвердились, с той лишь оговоркой, что размер ядерной вирусспецифической РНК сильно варьировал. Он колебался от  $1,5 \cdot 10^6$  до  $10 \cdot 10^6$  дальтон в зависимости от типа клеток (Wall, Darnell, 1971; Kajoki, 1972; Rozenblatt, Winocour, 1972; Petric, Hudson, 1972). В принципе такой размер вирусспецифической РНК мог быть обусловлен двумя обстоятельствами. Первое заключалось в том, что транскрибируемая РНК проходит в ядре несколько циклов репликации на вирусной ДНК без остановки, и, как следствие этого, РНК такого размера представляет несколько соединенных конец в конец копий вирусного генома. Эта гигантская молекула затем перед выходом из ядра в цитоплазму «разрезается» (Acheson et al., 1971). Второе предположение состояло в том, что высокомолекулярная вирусспецифическая ядерная РНК представляет собой молекулу, содержащую как клеточные, так и вирусные нуклеотидные последовательности. Это предположение оказалось более правильным, что вытекает из данных о гибридизации ядерной РНК как с вирусной, так и с клеточной ДНК (Acheson et al., 1971; Jaemisch, 1972; Weinberg et al., 1972a).

Для этого РНК из ядер сначала гибридизировали с ДНК вируса, затем из комплекса элюировали РНК и уже повторно гибридизировали с клеточной ДНК. Обнаружение в этом случае гибридов ДНК:РНК доказало существование последовательностей, типичных для клеточной РНК в составе гигантской ядерной вирусспецифической РНК.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что геном вирусов группы полиомы ковалентно связан с геномом клетки, причем места интеграции, по-видимому, не являются специфическими, поскольку эти точки не являются терминирующими при действии РНК-полимеразы и фермент работает на «гибридной» молекуле с такой же эффективностью, что и на клеточной ДНК. С другой стороны, в ядре зараженных клеток имеется какой-то фактор, осуществляющий специфическое «разрезание» гигантской РНК таким образом, что переходящая в цитоплазму вирусспецифическая РНК содержит только вирусные последовательности. Но, поскольку вирусная ДНК и в составе клеточной хромосомы имеет двунитевую структуру, возникал вопрос о том, происходит ли синтез вирусспецифической РНК на одной или обеих нитях ДНК или, другими словами, носит ли синтез асимметрический или симметрический характер. Впервые этот вопрос был поставлен в работах Ода и Дальбекко (Oda, Dulbecco, 1968a, b), Алони и др. (Aloni et al., 1968), Сауэра и Кидвай (Sauer, Kidwai, 1968). Алони и др., исследуя синтез вирусной РНК в клетках BSC-1, в которых происходила продуктивная инфекция вирусом SV40, обнаружили, что как «ранняя», так и «поздняя» РНК в весьма незначительной степени подвергаются «самоотжигу»<sup>1</sup>, что свидетельствовало об асимметрической транскрипции. В то же время «ранние» и «поздние» РНК различались по нуклеотидному составу и слабо конкурировали между собой при гибридизации с вирусной ДНК. На поздних стадиях инфекции количество вирусспецифической РНК было приблизительно в 40 раз выше, чем на ранних. В мышечных клетках 3Т3, трансформированных вирусом SV40, количество РНК в клетках соответствовало тому, которое наблюдалось на ранних стадиях инфекции. Сходные данные получили Сауэр и Кидвай (Sauer, Kidwai, 1968), которые использовали в качестве чувствительной системы клетки AGMK<sup>2</sup>. Эти данные были дополнены Мартином и Аксельродом (Martin, Axelrod, 1969), показавшими, что в клетках, трансформированных вирусом SV40, отсутствует транскрипция определенных фрагментов ДНК, а транскрипция других фрагментов в оди-

<sup>1</sup> «Самоотжиг» — ренатурация (т. е. медленное охлаждение после нагрева до 95°) препарата РНК. При наличии комплементарных нитей РНК, синтезированных на обеих нитях ДНК, должно происходить образование двунитевой РНК, устойчивой к РНК-азе.

<sup>2</sup> AGMK — клетки почек африканской зеленой мартышки.

наковой степени выражена как при литической инфекции, так и при трансформации.

Принципиально иная возможность исследования процессов симметрической и асимметрической транскрипции возникла после появления работы Вестфала (Westphal, 1970), который показал, что РНК-полимераза *E. coli* осуществляет в системе *in vitro* асимметрический синтез РНК на матрице суперциркулярной ДНК вируса SV40. Сходные данные несколько позднее получили Херцберг и Винокур (Herzberg, Winocour, 1970), использовавшие РНК-полимеразу из животных клеток, степень очистки которой была ниже, чем для бактериального фермента. Но и в этом случае одна из фракций фермента осуществляла асимметрический синтез РНК с коэффициентом седиментации 16S.

Фрид и Сокол (Fried, Sokol, 1972) более подробно проанализировали этот процесс синтеза *in vitro* и показали, что 25—50% молекул РНК имеют вес  $1,5 \cdot 10^6$  дальтон и не подвергаются самоотжигу, т. е. действительно имеет место асимметрическая транскрипция всего генома SV40. В то же время около 25% синтезируемых РНК имели молекулярный вес, превышающий  $3,0 \cdot 10^6$  дальтон, т. е. в данной системе отсутствовали факторы, осуществляющие терминацию процесса синтеза.

По-видимому, интактность молекулы ДНК имеет первостепенное значение для асимметрического синтеза, так как если используется фрагментированная молекула ДНК вируса SV40, то уровень синтеза резко падает, а главное — 20% синтезируемой РНК является симметрической (Defillipes, 1972; Fiers et al., 1974).

Таким образом, ДНК вируса SV40 полностью транскрибируется *in vitro* и синтезируемая РНК является комплементарной копией лишь одной из нитей ДНК. Значение этого эксперимента заключается в том, что открылись широкие методические подходы для расшифровки механизмов транскрипции вирусной ДНК. Каковы эти подходы?

Во-первых, возможность использования конкурентной гибридизации меченой РНК, синтезированной *in vitro*, и немеченой РНК из зараженных клеток на разных стадиях инфекции. Во-вторых, прямая гибридизация РНК, синтезированной *in vitro*, с клеточной РНК. В-третьих, использование синтезированной *in vitro* РНК для получения отдельных нитей клеточной ДНК с интегрированной в ней вирусной ДНК. Последняя процедура проводится следующим образом. Синтезированную РНК гибридизируют с денатурированной ДНК вируса SV40. В результате того, что РНК синтезировалась асимметрически, она будет комплексоваться лишь с одной из нитей ДНК, а вторая нить останется в свободном виде. Затем комплекс ДНК : РНК отделяют от однонитевой ДНК хроматографически, и РНК гидролизуют в составе гибрида щелочью. Полученные указанным способом отдельные



нити ДНК затем гибридизируют с РНК, выделенной из клеток, зараженных вирусом и получают информацию о том, какая из нитей ДНК транскрибируется на разных стадиях инфекции.

Следует подчеркнуть, что теоретический аспект этого вопроса был рассмотрен Л. Б. Меклером (см. 1972а), который впервые высказал предположение о считывании ранних и поздних генов с разных нитей вирусной ДНК.

В 1972 г. Лингстрем и Дальбекко (Lingström, Dulbecco, 1972) использовали указанный выше метод и показали, что на ранних стадиях инфекции происходит синтез РНК на одной из нитей ДНК, а на поздних стадиях происходит переключение синтеза на комплементарную нить. Естественно, что в трансформированных клетках синтез лимитирован лишь одной нитью. Эти данные получили полное подтверждение в последующей серии работ других лабораторий.

Так, Самбрук и др. (Sambrook et al., 1972), работая на модели вируса SV40, выделили две нити ДНК — Е-нить (или минус нить) и L-нить (или плюс нить). На Е-нити происходит синтез РНК *in vitro* и синтез «ранней» РНК как в продуктивно инфицированных, так и трансформированных клетках, на L-нити — синтез «поздней» РНК. Показано, что «ранняя» РНК содержит последовательности, комплементарные 30% Е-нити ДНК и не содержит последовательностей, комплементарных L-нити. РНК из трансформированных клеток гибридизировалась с 50% Е-нити ДНК. «Поздняя» РНК гибридизировалась с 30—35% Е-нити и с 70% L-нити ДНК. Эти данные свидетельствовали, что: во-первых, синтез «ранних» РНК продолжается и на поздних стадиях инфекции; во-вторых, синтез «поздних» РНК происходит только после начала синтеза дочерних молекул ДНК; в-третьих, на ранних этапах синтеза транскрибируются 30—35% Е-нити РНК, а на поздних этапах при продолжающемся синтезе «ранней» РНК начинается транскрипция комплементарной нити ДНК; в-четвертых, «ранние» и «поздние» РНК транскрибируются не только с разных нитей ДНК, но и с участков, не комплементарных один другому.

Сходные данные получили Кёри с сотр. (Khoury et al., 1972), которые показали, что «поздняя» РНК комплексирована с 40—42% Е-нити и с 60—64% L-нити, а «ранняя» РНК — с 35—39% Е-нити.

В дальнейшем Кёри с сотр. расширили свои исследования, проведя анализ многочисленных культур, трансформированных вирусом SV40 (Khoury et al., 1973а). Было обнаружено, что в девяти исследованных линиях Е-нить транскрибируется на 35—50%, а в двух линиях клеток — на 75%. Только в двух исследованных линиях клеток происходила весьма незначительная транскрипция L-нити.

Группа Самбрука (Ozanne et al., 1973) провела анализ как трансформированных культур, так и морфологических ревертантов некоторых линий этих культур. Методом кинетики реассоциации было показано что, как трансформированные, так и ревертантные линии клеток содержали одинаковое количество вирусных геномов (от 2 до 9). В этих трансформированных культурах имела место транскрипция 65—75% Е-нити ДНК, транскрипция L-нити не превышала 10—15%, но, по мнению авторов, данные в отношении L-нити не являлись достоверными. Однако интересное заключалось в том, что сходный уровень транскрипции с той же полярностью имел место и в ревертантных клетках. Из этих данных следует весьма важный вывод, что морфологический критерий не однозначен при решении вопроса, содержит ли клетка интегрированный геном или нет. Вероятно, следует подчеркнуть, что хотя на ранних стадиях литической инфекции и в трансформированных клетках происходит транскрипция примерно  $\frac{1}{3}$  вирусного генома, тем не менее, по-видимому, в трансформированных клетках транскрибируется несколько больший фрагмент Е-нити.

Однако не следует забывать о том, что в представленных выше опытах использовался препарат очищенной ДНК вируса SV40 и можно было предполагать, что в клетке, когда вирусная ДНК находится в составе хромосомы, процесс транскрипции может существенно отличаться от такового в системе *in vitro*. Опубликованные в последнее время две работы внесли ясность и в этот вопрос (Astrin, 1973; Shih et al., 1973). В обеих работах авторы использовали один и тот же подход — из трансформированных клеток выделяли хроматин и с помощью РНК-полимеразы исследовали возможность транскрипции этого хроматина в системе *in vitro*. Синтез в этом случае также происходил, он носил асимметрический характер, и уровень его был ниже, чем в классической системе, что вполне объясняется тем, что часть ДНК «закрыта» белком хроматина. Таким образом, можно предполагать, что в системе *in vivo* также имеет место асимметрическая транскрипция интегрированной ДНК.

Тем не менее имеются данные, в которых вопрос об асимметрическом синтезе ставится под сомнение. Еще в 1972 г. Керри и Мартин (Khoury, Martin, 1972) обнаружили, что *in vivo* часть вирусспецифической РНК транскрибируется симметрически. Наиболее подробно вопрос о симметрическом синтезе рассмотрен в работах Алони и др. (Aloni, 1972, 1973; Aloni, Locker, 1973).

В отличие от работ других авторов, цитированных выше, где применяли препараты стабильных РНК, Алони в своих опытах использовал импульсно-меченую РНК. Вначале он подтвердил данные об асимметрическом характере синтеза на ранних стадиях, но затем показал (Aloni, 1972), что на поздних стадиях литиче-

ской инфекции вирусом полиомы происходит (в случае импульсной метки) симметрическая транскрипция. Выявляемая в этом случае двуниевая РНК имела коэффициент седиментации 11S, что соответствовало молекулярному весу  $1 \cdot 10^6$  дальтон. Следовательно, согласно этим данным, около 30% вирусного генома на поздних стадиях транскрибируется по симметрическому типу. Но в то же время если РНК метили в течение длительного времени, «поздняя» РНК синтезировалась с одной нити ДНК.

Для объяснения этих фактов Алони (Aloni, 1973) выдвинул следующую гипотезу. Поскольку все вирусспецифические РНК содержат на 3'-конце фрагмент полиА, синтез которого не является матричным, можно полагать, что транскрипция РНК носит симметрический характер, затем происходит присоединение полиА-фрагмента на 3'-концах, затем деградация обеих нитей РНК с 5'-конца экзонуклеазой. Этот фермент действует таким образом, что около 50% цепей остается негидролизованной, причем устойчивые к действию нуклеазы нити РНК не комплементарны одна другой, но сохраняют фрагмент полиА.

Если этот механизм действительно имеет место, то он должен обладать весьма высокой специфичностью. Эта специфичность может определяться в основном двумя факторами: специфической последовательностью нуклеотидов в участке, где нуклеаза «останавливается», либо специфической конформацией молекулы РНК именно в участке остановки. Вряд ли можно предполагать, что 5'-экзонуклеаза сама по себе может прекратить деградацию молекулы РНК, начав на ней работать.

Для других групп ДНК-содержащих вирусов данных о транскрипции интегрированного генома значительно меньше, чем о транскрипции вирусов группы Рарова. Это объяснимо, поскольку геном других ДНК-содержащих вирусов значительно крупнее, чем у вируса полиомы, и исследование транскрипции в этом случае вызывает определенные трудности. Тем не менее в этой области имеется довольно обширная информация, относящаяся в основном к аденовирусам (см. Green, Hoadap, 1972).

Как известно, ДНК аденовирусов представлена двуниевой ДНК с мол. весом  $20-25 \cdot 10^6$  дальтон (Green et al., 1967). Фуджинага и Грин (Fujinaga, Green, 1968) первоначально обнаружили существование как в трансформированных, так и в литических инфицированных аденовирусами клетках вирусспецифическую РНК. Для ее обнаружения ДНК очищенного аденовируса иммобилизуют на фильтр и затем гибридизируют с тотальной РНК из зараженных клеток (Fujinaga et al., 1968). Было показано, что в клетках, зараженных различными аденовирусами, имеется свой спектр вирусспецифических РНК, характерных для данного вируса. Правда, наблюдается весьма незначительная перекрестная гибридизация, но каждая РНК отличается как по по-

следовательности нуклеотидов, так и по составу оснований (Fujinaga, Green, 1967).

В трансформированных клетках, по-видимому, имеет место транскрипция не всего генома, поскольку вирусспецифическая РНК содержит в своем составе 49—51% Г-Ц, в то время как ДНК вирусов содержит на 7—9% Г-Ц больше (Fujinaga et al., 1969).

Как и в случае инфекции вирусом полиомы, при продуктивной инфекции аденовирусом типа 2 происходит синтез двух типов РНК — «ранней» и «поздней» (Thomas, Green, 1969). Синтез «ранней» РНК продолжается на поздних стадиях инфекции, в то время как синтез «поздней» РНК на ранних стадиях практически не выявляется. В трансформированных клетках имеет место синтез только «ранней» РНК. Интересно (Waroquier et al., 1969), что перенос клеток, зараженных Ad2 в условия с температурой 42° вызывает abortивную инфекцию, но при этом не наблюдается различий в синтезе «ранних» РНК, т. е. блок транскрипции при переносе в непермиссивную температуру происходит где-то на уровне транскрипции «поздних» РНК.

Попытки выявить разницу в транскрипции ДНК онкогенных и неонкогенных аденовирусов в системе *in vitro* ничего не дали. Синтезируемая с помощью РНК-полимеразы *E. coli* РНК обладала в обоих случаях гетерогенным профилем седиментации в градиенте сахарозы (3—16S) (Warren, 1969).

Сравнивая литическую и abortивную инфекцию клеток аденовирусом типа 2, Фуджинага и Грин (Fujinaga, Green, 1970) установили, что в литически зараженных клетках синтез «ранней» РНК имеет место до 6 часа инфекции, при этом происходит транскрипция 8—20% ДНК, т. е. 2—10 генов. В трансформированных клетках считывается 4—10% вирусного генома (т. е. 1—5 генов). Таким образом, в трансформированных клетках транскрипция генома выражена еще в меньшей степени, чем вирусной ДНК на ранних стадиях литической инфекции. Синтез «поздней» РНК начинается с 18 час. и происходит только при литической инфекции. При этом, как было показано ранее, синтез «ранней» РНК продолжается. Эти данные были уточнены Лукас и Гинсберг (Lucas, Ginsberg, 1971), которые методом конкурентной гибридизации показали в литически зараженных клетках наличие трех классов вирусспецифической РНК: два класса «ранних» РНК, причем синтез одного класса начинается до начала синтеза вирусной ДНК и основная масса этой РНК деградирует к 18 час. инфекции, и «ранняя» РНК другого класса, синтез которой начинается до начала синтеза ДНК и продолжается с высокой скоростью и на поздних стадиях инфекции. Третий класс вирусспецифических РНК представлен «поздними» РНК, чей синтез начинается после инициации репликации вирусной ДНК.



Парсонс и Грин (Parsons, Green, 1971) провели седиментационный анализ РНК, выделенных из клеток на разных стадиях инфекции, и показали, что «ранние» литические РНК представлены двумя формами — 23S и 16S, при этом синтез этих РНК не подавляется ингибиторами синтеза белка. В трансформированных крысиных клетках цитоплазматическая РНК обладала большей гетерогенностью и седиментировала в зоне 10—30S. Еще большей гетерогенностью обладала вирусспецифическая РНК в ядрах клеток (4—45S). Как и в случае вирусов группы Парова, эта ядерная РНК содержала как клеточные, так и вирусные последовательности, и для того чтобы эти РНК могли комплексоваться с полисомами, необходимо ее предварительное расщепление (Raskas, 1974; Tsuei et al., 1972; Shimada et al., 1972; McGuire et al., 1972; Wall et al., 1973).

Рашка и Строл (Raška, Strohl, 1972) сравнивали вирусспецифическую РНК из хомячковых клеток ВНК-21, трансформированных аденовирусом типа 12, и из опухолей хомячка, индуцированных этим же вирусом. Дополнительные виды вирусспецифической РНК в опухолевых клетках обнаружить не удалось.

Что касается ориентации транскрипции, то Грин и Ходар (Green, Hodar, 1972) показали, что в системе *in vitro* с помощью РНК полимеразы *E. coli* имеет место асимметрическая транскрипция РНК. При этом продуцируются те же виды РНК, что и на ранних стадиях инфекции.

Последние данные с использованием метода конкурентной гибридизации говорят о том, что в цитоплазме клеток, зараженных аденовирусами, на ранних стадиях инфекции выявляются четыре класса информационной РНК, свидетельствуя о том, что на ранних стадиях идет транскрипция с четырех генов вирусной ДНК. На поздних этапах инфекции каждый участок ДНК (та или другая цепь) транскрибируется и его продукт, т. е. информационная РНК, обнаруживается в цитоплазме (Craig et al., 1974; Philipson et al., 1974).

Это практически все, что мы знаем о транскрипции интегрированного генома аденовируса в клетках. Как следует из этих данных, имеется много общего с вирусами группы Парова, однако механизм как интеграции, так и экспрессии вирусного генома при аденовирусной инфекции изучен в значительно меньшей степени и поэтому говорить о каких-то контрольных механизмах, регулирующих эти процессы, вряд ли представляется возможным.

И уже совсем мало мы знаем о транскрипции ДНК вирусов группы герпеса. Имеющиеся единичные работы вряд ли могут дать какую-либо информацию, в достаточной степени достоверно освещающую процессы транскрипции вирусного генома.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА ВИРУСОВ  
ГРУППЫ РАУВА

Существование асимметрического синтеза РНК на матрице интегрированной в геном клетки ДНК вирусов полиомы или SV40, открыло перспективы картирования отдельных функций вирусного генома, поскольку в настоящее время хорошо известно, что ряд вирусспецифических белков, в частности Т-антиген, являются продуктом «ранних» генов, в то время как другие белки, например капсидные, являются продуктом «поздних» генов.

В то же время картирование таких функций на цельной молекуле вирусной ДНК было в достаточной степени затруднительным. Но в последнее время было разработано два метода, позволяющих исследовать молекулярную и генетическую структуру генома вируса SV40: 1) анализ функций участков различной длины генома этого вируса, интегрированных в геном аденовируса типа 2 (недефектные гибриды Ad2:SV40); 2) специфический разрыв молекулы ДНК вируса SV40 в определенных участках с помощью бактериальных ограничивающих нуклеаз (рестриктаз).

Недефектные (ND) гибриды Ad2·SV40 являются рекомбинантами аденовируса типа 2 и вируса SV40, способными к репликации. Эти гибриды (обозначаемые от Ad2<sup>+</sup>·ND<sub>1</sub> до Ad2<sup>+</sup>·ND<sub>5</sub>) индуцируют антигены, специфичные для SV40 и SV40-специфичную РНК в процессе литической инфекции (Lewis et al., 1969). Опыты по ДНК:РНК гибридизации показали, что эти вирусы содержат различные количества ДНК вируса SV40 и индуцируют перекрывающиеся последовательности РНК, специфичной для SV40, пропорционально количеству ДНК вируса SV40, которую они содержат (Henry et al., 1973; Levine et al., 1973). Было обнаружено, что каждый дефектный гибридный вирус содержит один сегмент ДНК вируса SV40, ковалентно встроенный в специфический участок молекулы ДНК аденовируса типа 2.

Что касается второго метода, то в ряде лабораторий из различных бактерий выделены так называемые рестриктазы, т. е. нуклеазы с ограниченным спектром действия. Для ДНК вируса SV40 были использованы следующие рестриктазы: рестриктаза R<sub>1</sub> из штамма *E. coli*, несущего fi<sup>+</sup>R-фактор. Этот фермент вызывает разрыв молекулы ДНК вируса SV40 в специфическом участке, который принят за нулевую точку на карте SV40 (Hedgpeth et al., 1972; Mertz, Davis, 1972; Morrow, Berg, 1972; Mulder, Delius, 1972).

Следующая рестриктаза — это рестриктаза *H. influenzae*, разрывающая двунитовую ДНК в специфической гексануклеотидной последовательности (Kelly, Smith, 1970). Как показали Данна и Натанс (Danna, Nathans, 1971), этот фермент вызывает специфич-

ческие разрывы и в молекуле ДНК SV40, при этом образуются 11 фрагментов, которые можно разделить методом электрофореза в полиакриламидном геле. Размер фрагмента А составлял 24% длины всей молекулы, В—18%, С и D—по 10,5, Е и F—по 7,5, G—7, H—3,9, I—5,3, J—4,1, K—3,6%.

Кроме того, для получения отдельных крупных фрагментов ДНК использовали и другие бактериальные эндонуклеазы, в частности рестриктазу *H. parainfluenzae*. На основании этих данных

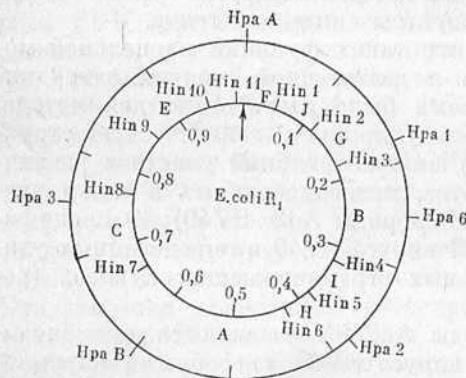


Рис. 1. Карта генома вируса SV40 по данным Данна и др. (Danna et al., 1973)

была составлена генетическая карта ДНК вируса SV40, которая представлена на рис. 1 (Danna et al., 1973).

После получения отдельных фрагментов ДНК их исследовали на способность гибридизоваться с вирусспецифической РНК, выделяемой из зараженных клеток на разных стадиях инфекции (Khoury et al., 1973b). Оказалось, что «ранняя» РНК комплементарна Е-нитям фрагментов А, Н, I и В. В то же время «поздняя» РНК гибридизовалась с L-нитями фрагментов А, С, D, Е, К, F, J, G и В. Транскрибируемые фрагменты как для «ранней», так и для «поздней» РНК непрерывны на генетической карте вируса SV40. Затем та же группа авторов показала, что транскрипция имеет последовательность от 5'-конца к 3'-концу молекулы, как это и происходит во всех случаях транскрипции. При этом на Е-нити транскрипция идет в направлении А→Н→I→В, в то время как на L-нити транскрипция идет в противоположном направлении, т. е. от фрагмента А к фрагменту В по часовой стрелке (рис. 2).

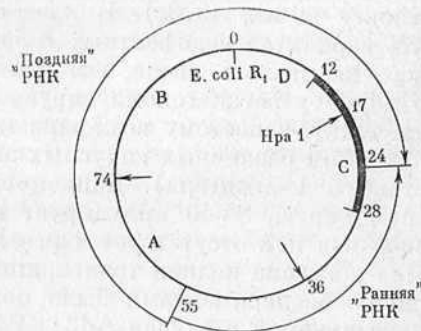
Такой же подход к картированию ранних и поздних РНК был использован и Самбрук и др. (Sambrook et al., 1973). Они использовали две рестриктазы  $R_1$  из *E. coli* и *H. parainfluenzae*. Были получены четыре фрагмента, соответствующие 38%, 26%, 19% и 17% вирусного генома. Скоррелировав полученные ими данные с ранее опубликованными, авторы предлагают свою кар-

ту генома вируса SV40, которая хорошо согласуется с ранее представленными картами.

Следующим этапом работы было определение направления синтеза «ранней» и «поздней» РНК. Были получены данные, подтверждающие, что синтез «ранней» РНК идет против, а «поздней» — по часовой стрелке. При определении локализации последовательностей РНК обоих типов на «карте» вирусного генома обнаружено, что около 50% Е-нити фрагмента А и 60% последовательностей Е-нити фрагмента С формируют гибрид с ранней

Рис. 2. Карта генома вируса SV40 по данным Самбрука и др. (Sambrook et al., 1973).

Точка разрыва рестриктазой R<sub>1</sub> *E. coli* находится в положении 0. Расстояния на карте даны по часовой стрелке в процентах длины генома вируса SV40. Сегмент ДНК вируса SV40, содержащийся в гибриде аденовирус: SV40 (Ad2-ND<sub>1</sub>), показан утолщенной линией. Точки действия HpaI взяты из работы Данна и др. (Danna et al., 1973).



РНК. В сумме это дает величину около 31% от всей Е-нити генома, что соответствует ранее полученным данным. Поскольку ранняя РНК транскрибируется с непрерывных последовательностей вирусного генома и известно направление синтеза РНК, был сделан вывод, что 5'-конец стабильной РНК вируса SV40 расположен в положении 55, а 3'-конец — в положении 24 на генетической карте SV40. При использовании «поздней» РНК были получены следующие результаты: 45% L-нити и 52% Е-нити фрагмента А, 90% L-нити и 0% Е-нити фрагмента В, 26% L-нити и 60% Е-нити фрагмента С и 92% L-нити и 0% Е-нити фрагмента D образуют гибрид с полисомальной РНК из зараженных клеток, т. е. в сумме «поздняя» РНК комплементарна 64% последовательностей L-нити и 31% последовательностей Е-нити ДНК вируса SV40.

Из этих данных следует, что:

1) все ранние функции ДНК вируса SV40 локализованы во фрагментах А и С;

2) все последовательности фрагментов В и D и часть последовательностей фрагментов А и С ответственны за кодирование поздних вирусных функций;

3) переключение синтеза с одной цепи на другую имеет место в положениях 55 и 24.

Следует подчеркнуть, что такая картина наблюдалась, если для гибридизации использовали полисомальную РНК; если же для гибридизации применяли тотальную цитоплазматическую РНК, то



эта РНК имела молекулы, комплементарные 77% L-нити и 44% E-нити ДНК вируса SV40. Это означает, что на поздних этапах может иметь место симметрическая транскрипция 14—20% каждого из четырех фрагментов генома. Эти данные согласуются с результатами, полученными Алони и др. (Aloni et al., 1973).

Интересно, что в полисомах зараженных клеток обнаруживаются РНК, не способные к самоотжигу, что предполагает возможность существования в клетках вирусспецифических полисом, причем различных для «ранней» и «поздней» вирусной РНК.

Ориентации транскрипции посвящена работа Кёри с соотр. (Khoury et al., 1973c). В качестве модели были использованы пять вариантов недефектных гибридных вирусов Ad2:SV40. Как уже указывалось выше, все эти варианты содержат различные по длине участки генома вируса SV40, но имеют общую концевую точку, и поэтому возможна корреляция синтеза ранней РНК с синтезом различных вирусных антигенов (Т-антигена, TSTA-антигена и U-антигена). Данная система удобна еще и тем, что геном вируса SV40 индуцирует в ней только продукты ранних генов и в ней отсутствует синтез капсидных белков. В системе была показана полная транскрипция E-нити генома вируса SV40. Однако экспериментами было показано, что виды ранней РНК, синтезируемой в случае Ad2:SV40 инфекции, содержат в своем составе не только «ранние» последовательности, но и прилегающие к ним на той же нити «антипоздние» последовательности. Отсюда авторы делают важный вывод о том, что при инфекции диким типом и гибридным вирусом имеются существенные различия в регуляции транскрипции. По-видимому, при инфекции диким типом инициация синтеза «ранней» вирусспецифической РНК ассоциирована с участком, отвечающим за синтез Т-антигена, а синтез затем проходит в направлении участка U-антигена. Среди изученных гибридных вирусов лишь Ad2<sup>+</sup>ND<sub>4</sub> содержит участок, отвечающий за синтез Т-антигена, и авторы подвергают сомнению возможность, что TSTA- и U-участки имеют собственные промоторы для транскрипции. Отсюда следует, что в случае гибридных вирусов транскрипция иницируется на аденовирусной ДНК, а терминируется на участке, общем для сегментов вируса SV40 в гибридном вирусе. Аналогичные данные были получены и в других работах (Kelly, Lewis, 1973; Moggow et al., 1973).

В последнее время, кроме этих работ, связанных с картированием генов вирусов группы полиомы, появились сообщения, которые сводят воедино представленные выше данные о транскрипции интегрированного вирусного генома. Оказалось, что на ранних стадиях инфекции происходит транскрипция 50% генома вируса SV40 с E-нити (Kamen et al., 1974). Синтезируемая в этом случае РНК с коэффициентом седиментации 19S обнаруживается в цитоплазме и, по-видимому, осуществляет синтез Т-ан-

тигена (Weil et al., 1974). На поздних стадиях в цитоплазме обнаруживаются два вида РНК — 19S и 16S, но обе эти РНК синтезируются с L-нити другой половины клеточного генома, причем 16S РНК является «составной», но тем не менее независимой частью генома. 16S «поздняя» РНК кодирует синтез белка VP1 (основного белка капсида), а 19S «поздняя» РНК — белкового предшественника, распадающегося затем на капсидные белки VP2 и VP3 (Prives et al., 1974). Из этих данных следует, что в составе «позднего» генома имеются два гена — один ген осуществляет синтез структурных белков капсида, а функция другого гена (его размер — разница между участками, осуществляющими синтез 16S и 19S «поздних» РНК), синтезирующего какой-то белок VP-х, остается неизвестной.

С другой стороны, на ранних стадиях как при литической, так и при abortивной инфекции работает лишь один ген, осуществляющий синтез Т-антигена. Этому антигену, имеющему внутриядерную локализацию и обладающему молекулярным весом 70 000 дальтон (Livingston, Henderson, 1974), по-видимому, принадлежит первостепенная роль в первичных процессах трансформации и поддержания статуса трансформированной клетки.

Однако в том случае, когда для гибридизации использовали вирусспецифическую РНК из ядер клеток, содержащую как клеточные, так и вирусные последовательности, наблюдается симметрический синтез РНК (Aloni, 1973). Если принять во внимание тот факт, что в цитоплазме обнаруживаются только определенные виды РНК, некомплементарные одна другой, то остается признать правильность предположения Алони (Aloni, 1973) о симметрическом характере транскрипции. В то же время эти данные свидетельствуют о специфическом процессе «деградации» ядерных молекул вирусспецифической РНК на разных стадиях инфекции, который приводит к образованию определенных видов РНК.

Таким образом, регуляция активности вирусного генома осуществляется, по-видимому, на нескольких уровнях: 1) на уровне синтеза РНК на разных нитях ДНК; 2) на уровне синтеза РНК в ассоциации с клеточной РНК; 3) на уровне считывания полной или частичной копии интегрированного генома; 4) на уровне специфической «резки» синтезированных молекул РНК (деградация определенной L или E-нити); 5) на уровне взаимодействия вирусспецифической РНК с полисомами.

Все приведенные выше данные свидетельствуют о том, что в настоящее время имеются вполне реальные предпосылки к составлению полной функциональной карты генома мелких ДНК-содержащих вирусов и к расшифровке механизма злокачественной трансформации клеток этими вирусами, механизма, в основе которого лежит интеграция вирусного и клеточного геномов, что является основным постулатом вирусно-генетической теории.

---

## Глава седьмая ИНТЕГРАЦИЯ ГЕНОМА ОНКОРНАВИРУСОВ

При анализе интеграции генома онкорнавирусов в клеточный геном первый и основной вопрос заключался в том, каким образом может происходить интеграция вирусной РНК в состав клеточной ДНК. Естественно, что с химической точки зрения такой процесс маловероятен. Поэтому Темин (Temin, 1964a, b), основываясь на собственных экспериментальных данных об ингибировании продукции вируса Рауса актиномицином Д, предположил, что онкорнавирусы в процессе своей репродукции синтезируют собственную вирусную ДНК. Эту форму ДНК Темин назвал провирусом.

Вероятно, здесь уместно вспомнить о том, что провирусная гипотеза Темина появилась в 1964 г., когда полностью подтвердилось центральное положение молекулярной биологии о том, что передача генетической информации идет по схеме ДНК→РНК→→белок. Гипотеза Темина вводила в эту схему принципиально новый этап РНК→ДНК. Теория эта, встреченная большинством исследователей с явным недоверием, тем не менее хорошо согласовывалась с основным положением вирусно-генетической теории об интеграции клеточного и вирусного геномов, а главное — объясняла его.

Понадобилось шесть лет для того, чтобы гипотеза Темина (после открытия обратных транскриптаз) получила экспериментальное подтверждение.

Однако следует отметить, что в течение этих шести лет появились работы, в которых были получены данные, косвенно подтверждающие существование провирусной ДНК.

Это прежде всего работы Бадера и Бадера (Bader, 1964, 1965; Bader, Bader, 1970) и Балдуччи и Моргана (Baldužži, Morgan, 1966). И в той и в другой работе использовали бромдезоксириндин (BudR), который вносили в клетки, когда там репродуцировали вирус Рауса (BudR, как известно, не включается в РНК, но включается в состав ДНК). Образующаяся в этом случае вирионная РНК потомства, если она действительно синтезировалась на матрице ДНК, должна была в своей первичной структуре иметь определенные «ошибки», и, как следствие, вирусное потомство,

должно было бы быть неинфекционным. Это и нашло экспериментальное подтверждение в работе Бадера.

Балдуччи и Морган после обработки зараженных клеток бромдезоксипуридином облучали их видимым светом, что также приводило к инактивации ДНК и, как следствие этого, к потере клетками способности синтеза инфекционного вируса.

Было также показано, что синтезируемая ДНК специфична для заражаемого онкорнавируса. Дусберг и Фогт (Duesberg, Vogt, 1969) предположили, что если ДНК действительно необходима для репродукции онкорнавируса, то суперинфекция другим онкорнавирусом не должна требовать нового синтеза клеточной ДНК, если специфичность отсутствует. Однако это оказалось не так. Суперинфекция вирусом саркомы Рауса клеток кур, зараженных вирусом RAV-2, оказалась чувствительной к актиномицину Д.

Следовательно, казалось бы, еретическое предположение Темина начало обрести экспериментальными данными, его подтверждающими. Открытие в составе онкорнавирусов обратных транскриптаз (Temin, Mizutani, 1970; Baltimore, 1970) окончательно поставило все на свои места, ибо стал принципиально понятен возможный цикл репродукции онкорнавирусов, включая стадию провирусной ДНК.

Итак, из вышеизложенного следует, что основные особенности интеграции РНК-содержащих от ДНК-содержащих онкогенных вирусов сводятся к необходимости предварительного переписывания РНК в ДНК при помощи комплекса ферментов, осуществляющих этот процесс.

Если в случае ДНК-содержащих вирусов белковые компоненты вириона вряд ли принимают какое-либо участие в процессе интеграции, за исключением, быть может, вирусспецифической эндонуклеазы (Kaplan et al., 1972; Kidwell et al., 1972; Greenaway, 1973), то в случае онкорнавирусов компоненты частицы играют первостепенную роль в этом процессе. Поэтому в данном разделе будут рассмотрены не только молекулярно-биологические аспекты интеграции генома онкорнавирусов, но и те особенности нуклеинового и белкового компонентов вирусной частицы, которые делают возможным процесс интеграции.

## ГЕНОМ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ

### *Высокомолекулярная РНК*

Как указывалось выше, геном онкорнавирусов представлен РНК с общим молекулярным весом  $10-12 \cdot 10^6$  дальтон.

Детальное физико-химическое и химическое исследование РНК онкорнавирусов началось в 1965 г. с работы Робинсона и др. (Robinson et al., 1965), которые использовали вирус Рауса, ме-



ченный по  $^3\text{H}$ -уридину. Экстрагированную из очищенного вируса РНК анализировали седиментацией в градиенте сахарозы в присутствии немеченой РНК с известной константой седиментации.

Этим методом было показано, что РНК вируса Пауса имеет высокую константу седиментации (60—70S) и чувствительна к действию РНК-азы, т. е. является однонитевой. Кроме того, в препаратах тотальной вирусной РНК присутствовала примесь низкомолекулярной РНК с константой седиментации 5—10S.

В дальнейшем при анализе практически всех РНК-содержащих онкогенных вирусов в их составе были обнаружены два основных компонента РНК — высокомолекулярный (60—70S) и низкомолекулярный (4—10S) (Robinson, Baluda, 1965; Duesberg, Robinson, 1966, 1968; Granboulan et al., 1966; Mora et al., 1966; Robinson et al., 1967; Blair, Duesberg, 1968; Duesberg, Cardiff, 1968; Franker, Riebek, 1968; Bader, Steck, 1969; Erikson, 1969; Faras, Erikson, 1969; Kakefuda, Bader, 1969; Jarrett et al., 1971; McClain, Kirsten, 1972; Roy-Burman, Kaplan, 1972; Nichols, Waddell, 1973; Vidrine et al., 1973).

60—70S РНК разных типов онкорнавирусов имеют сходный нуклеотидный состав, причем, как правило, в этих РНК содержится примерно равное количество каждого из рибонуклеотидов (Duesberg, 1968; Franker, Riebeck, 1968; Jarrett et al., 1971; Roy-Burman, Kaplan, 1972).

60—70S РНК обнаружены в вирусах как С-типа, так и В-типа. Однако детальному исследованию подверглись РНК только вирусов С-типа, так как получение препаратов РНК вирусов В-типа связано с определенными методическими трудностями из-за отсутствия адекватных клеточных систем *in vitro*. Почти все данные, приведенные ниже, относятся к вирусам С-типа.

При общем сходстве нуклеотидного состава тем не менее все высокомолекулярные вирусные РНК различаются по нуклеотидным последовательностям. Так, методами молекулярной гибридизации было показано, что разные вирусы мышей весьма сходны, но тем не менее различны по этому критерию. Уровень гибридизации — 40—60%. Аналогичная картина наблюдалась и для двух онкорнавирусов приматов (SSV и GAL). Вирусы, выделенные от разных классов млекопитающих, значительно различались между собой по данным молекулярной гибридизации (менее 10% гомологии) (Benveniste, Todaro, 1973). Характерно также, что эндогенные вирусы (см. главу 8) различных видов млекопитающих также различались по нуклеотидным последовательностям (East et al., 1973c). Было обнаружено одно, но тем не менее важное исключение из представленных выше данных, заключающееся в том, что высокая гомология (11—28%) выявлялась у геномов вирусов С-типа мышей и приматов. Такой уровень генетического родства, вероятно, позволит в будущем использовать ви-

русы мышей в тестах молекулярной гибридизации для выявления вирусной генетической информации в клетках приматов и человека (Benveniste, Todaro, 1973).

Две группы онкорнавирусов птиц (лейкозно-саркоматозный комплекс и ретикуло-эндотелиозный комплекс) также различны по нуклеотидным последовательностям (Kang, Temin, 1973).

Метод молекулярной гибридизации с использованием синтезированного *in vitro* с помощью обратной транскриптазы ДНК продукта (см. ниже) открывает широкие перспективы не только для анализа генетического родства между отдельными вирусами, но также и для анализа включения генетического материала хозиина или эндогенных вирусов в геном реплицирующегося вируса. Первые попытки в этом направлении уже сделаны. Скольник и др. (Scolnick et al., 1973b) показали, что РНК вируса саркомы мышей (Кирстен), реплицирующегося в клетках крыс, содержит два типа нуклеотидных последовательностей. Один характерен для вируса саркомы мышей, а другой — для эндогенного вируса крыс. Такие же данные получены и для вируса саркомы Харви (Scolnick, Parks, 1974a).

По-видимому, имеющиеся в настоящее время данные о нуклеотидных последовательностях в геномной РНК свидетельствуют о том, что вирусы каждой группы животных имеют свою характерную последовательность нуклеотидов, специфичную, тем не менее, для каждого вируса.

Обнаружение в составе онкорнавирусов 60—70S РНК поставило перед исследователями и другой вопрос. Почему 60—70S РНК, если она представляет собой полный вирусный геном, кодирует синтез лишь 10—12 вирусных белков, молекулярный вес которых в среднем не превышает 30 000 дальтон, в то время как такая высокомолекулярная РНК способна направлять синтез 30—40 вирусспецифических белков с мол. весом 35 000 дальтон?

Трудно, естественно, было предполагать, что онкорнавирус индуцирует в клетках синтез остальных 20—30 белков. Возникло два альтернативных предположения: или РНК в своем составе имеет очень большое количество нетранслируемых участков или 60—70S РНК представляет агрегат из нескольких более мелких молекул РНК.

При дальнейшем изучении 60—70S РНК обнаружена характерная особенность, заключающаяся в том, что при кратковременном прогреве (2 мин. при температуре 80°) происходит уменьшение константы седиментации РНК до 35—37S (Duesberg, 1968; Duesberg, Cardiff, 1968; Montagnier et al., 1969; McCain et al., 1973). Было установлено, что это снижение константы седиментации обусловлено не изменением конформации молекулы, а уменьшением молекулярного веса РНК (Duesberg, 1968). Аналогичные данные получены практически для всех онкорнавирусов С- и В-

типа и с использованием метода электрофореза в полиакриламидном геле. На основании этих данных сделан вывод о том, что геном онкорнавирусов фрагментирован и состоит из 3—4 субъединиц с молекулярным весом  $2,5 \cdot 10^6$  дальтон.

Тот факт, что в составе высокомолекулярной РНК онкорнавирусов обнаружено несколько субъединиц, свидетельствует о том, что эти РНК представляют собой сложный комплекс, состоящий из нескольких компонентов. А если это так, то конформация такого комплекса может существенно влиять на его седиментационные характеристики, а отсюда и на интерпретацию получаемых результатов. В подтверждение этому можно привести данные Трагничека и др. (Travnicek et al., 1973) о существовании двунилевых фрагментов в комплексе 60—70S РНК и недавно появившееся сообщение Мангеля и др. (Mangel et al., 1974), которые использовали белок гена 32 фага Т4, способного к «расплетанию» двунилевых полинуклеотидов, и исследовали при помощи электронной микроскопии влияние этого белка на 60—70S РНК RSV. Оказалось, что 60—70S РНК состоит лишь из двух субъединиц с мол. весом  $3 \cdot 10^6$  дальтон каждая, причем эти субъединицы могут комплексоваться одна с другой в нескольких местах. В какой мере эти данные отражают истинное количество субъединиц в составе 60—70S РНК, сказать трудно, так как в данном случае невольно возникает вопрос: если суммарный вес двух субъединиц составляет  $6 \cdot 10^6$  дальтон, а общее содержание РНК в вирионе —  $12 \cdot 10^6$ , то какую же функцию выполняют остальные РНК, общий молекулярный вес которых также должен составлять  $6 \cdot 10^6$  дальтон?

Несмотря на то, что изучение РНК онкорнавирусов началось около 10 лет назад и до настоящего времени структура генома этих вирусов остается неясной. В качестве примера можно привести последнюю работу Беллами и др. (Bellamy et al., 1974), которые, используя классические физические методы исследования как вирусных частиц, так и РНК, показали, что общее содержание РНК в вирионе составляет  $6 \cdot 10^6$  дальтон, а молекулярный вес интактной РНК находится в пределах  $3,5—4,5 \cdot 10^6$  дальтон. Эти данные свидетельствуют о наличии лишь одной субъединицы РНК. Как согласовать эти результаты с перечисленными выше фактами, сказать трудно, но нельзя исключить возможность того, что в самое ближайшее время нам предстоит значительная ревизия наших знаний о геноме онкорнавирусов.

Обнаружение в составе вирусного генома нескольких субъединиц РНК выдвинуло новые вопросы, из которых основным, по-видимому, является вопрос о химической и биологической идентичности субъединиц.

Что касается химической идентичности, то мы можем в этом случае базироваться в основном на данных по изучению конце-

вых последовательностей в РНК. Так, оказалось, что как в 60—70S РНК, так и в 35—37S субъединицах этой РНК 5'-концевой нуклеотид представлен аденином (Silber et al., 1973; Frank et al., 1974). Что касается 3'-концевого нуклеотида, то группа Замечника (Stephenson et al., 1972a) обнаружила в вирусе миелобластома кур аденозин, в то время как три другие группы исследователей как в составе 60—70S РНК AMV, так и в составе 35—37S РНК идентифицировали в качестве 3'-концевого нуклеотида уридин (Erikson et al., 1974; Maruyama et al., 1974; Robin et al., 1972), что свидетельствует по крайней мере о химическом сходстве субъединиц.

Хотя вопрос о 3'-концевом нуклеотиде остается спорным, полученные в последнее время различными способами данные говорят в пользу того, что в высокомолекулярной РНК вирусов С-типа птиц и млекопитающих на 3'-конце молекулы находится аденин (Rho, Green, 1974; Keith et al., 1974; Phillips et al., 1974).

Второй подход к изучению однородности субъединиц связан с тем, что высокомолекулярная 60—70S РНК содержит в своем составе фрагмент полиА на 3'-конце молекулы. Размер этого фрагмента — 150—200 нуклеотидов (Green, Cartas, 1972). ПолиА обнаружен у 60—70S РНК, выделенной из большинства онкорнавирусов (Ross et al., 1972; Gillespie et al., 1972). Показана также и его ассоциация с 35—37S субъединицами. Неясно, образуется такая ассоциация со всеми субъединицами или с некоторыми из них. По-видимому, полиА есть во всех субъединицах (Lai, Duesberg, 1972; Phillips et al., 1974), однако детальному изучению не подвергались РНК других вирусов. Вопрос же этот представляет особый интерес, поскольку известно, что последовательности полиА обнаружены в клеточных информационных РНК (Darnell et al., 1974; Lee et al., 1974) и у тех вирусов, РНК которых выполняют функцию информационной (такие вирусы, как полиомиелит, Синдбис и т. д. — см. Armstrong et al., 1972; Johnston, Bose, 1972).

Последние данные говорят о том, что каждая субъединица РНК содержит один полиА-фрагмент. В вирусе M-MSV (MuLV) 3'-концевая последовательность в 60—70S РНК имеет следующий состав: ...Г(ЦУ)A<sub>190</sub>A<sub>OH</sub> (Rho, Green, 1974; Quade et al., 1974a).

Основная функция информационных РНК — синтез белка в полисомах. Способны ли 60—70S или 35—37S субъединицы вирусной РНК к трансляции? Показано, что в бесклеточной белок-синтезирующей системе РНК онкорнавирусов направляет синтез белка, сходного с gS-антигеном (Siegert et al., 1972; Twardzik et al., 1973). Можно думать, что и в клетке эта РНК транскрибируется. Однако какая из РНК — родительская или дочерняя? Этот вопрос имеет большое биологическое значение, поскольку если родитель-



ская РНК будет обнаружена в ассоциации с полисомами, то, вероятно, эта РНК будет осуществлять синтез каких-то белков, необходимых для процесса репликации вируса. Если же в полисомах будет обнаруживаться только дочерняя РНК, то можно предполагать, по аналогии с другими вирусными системами, что эта РНК будет осуществлять синтез белков вириона. С другой стороны, возможно, что из 3—4 субъединиц вирусной РНК лишь некоторые способны к трансляции и ассоциируются с полисомами. Такое предположение правомерно, если допустить факт функциональной неоднородности субъединиц вирионной РНК.

Кроме высказанных выше предположений о значении полиА, Грин и Каркас (Green, Cartas, 1972) считают, что фрагменты полиА могут выполнять одну из следующих функций — служить сигналом для полимеразы при обратной транскрипции РНК, принимать участие в сборке 60—70S молекулы РНК, транслироваться в полилизин, который может выполнять регуляторные функции при транскрипции РНК.

По-видимому, наиболее интересная проблема при изучении организации генома — вопрос о сходстве или различии субъединиц в лейкозных и саркоматозных вирусах. В этом плане перспективно изучение трех групп вирусов:

- 1) саркоматозных недефектных вирусов, способных к одновременной трансформации фибробластов и образованию инфекционного потомства;
- 2) лейкозных вирусов птиц и млекопитающих, не вызывающих трансформации фибробластов *in vitro*, но способных к независимой репликации;
- 3) трансформирующих саркоматозных вирусов млекопитающих, реплицирующихся только в присутствии вируса-«помощника» (дефектные вирусы).

Первую попытку такого сравнительного анализа проделали Дусберг и Фогт, которые анализировали диссоциированные нагреванием препараты 60—70S РНК вирусов птиц методом электрофореза в полиакриламидном геле (Duesberg, Vogt, 1973a).

Выяснилось, что геном саркоматозных вирусов птиц содержит два типа субъединиц *a* и *b*, в то время как лейкозные вирусы содержат лишь субъединицы *b*, имеющие меньший молекулярный вес. В мутантах саркоматозных вирусов, утративших способность к трансформации, также отсутствовала субъединица *a*. На основании этих данных Дусберг и Фогт сделали весьма важный вывод о том, что функционально субъединицы неоднородны и что субъединица *a* несет функцию, ответственную за трансформацию. Однако, как показали дальнейшие эксперименты, вопрос оказался сложнее.

Шеле и Ханафуза (Scheele, Hanafusa, 1972), анализируя тотальный препарат вирусной РНК, диссоциированной нагреванием,

не обнаружили наличия двух субъединиц; во всех препаратах РНК как саркоматозных, так и лейкозных вирусов присутствовал лишь один тип субъединицы вирусной РНК. Следует подчеркнуть, что данные такого рода ранее были получены Болоньези и Графом (Bolognesi, Graf, 1971), которые, правда, обнаружили, что РНК саркоматозных вирусов, как правило, имеет несколько больший молекулярный вес, чем РНК лейкозных вирусов.

При проверке собственных экспериментальных данных Дусберг и др. (Martin, Duesberg, 1972; Lai et al., 1973; Duesberg, Vogt, 1973b) также установили, что в том случае, когда используются клональные варианты саркоматозных вирусов птиц никаких двух субъединиц *a* и *b* обнаружить не удается, — выявляется лишь субъединица *a* (с большим молекулярным весом). Характерно, что размер субъединицы *a* колебался у различных типов саркоматозных вирусов. Мутация вируса саркомы, сопровождающаяся потерей им способности трансформировать фибробласты приводила к потере части РНК и к появлению другой субъединицы, по размерам соответствующей субъединице *b*. При анализе же РНК лейкозных вирусов птиц в них была обнаружена только субъединица *b*. Было высказано предположение, что все субъединицы саркоматозных и лейкозных вирусов имеют общий полинуклеотидный фрагмент, соответствующий субъединице *b*. В саркоматозных вирусах имеется дополнительный фрагмент *x*, присоединение которого к субъединице *b* сопровождается увеличением молекулярного веса и образованием субъединицы *a*. Соответственно мутация вируса, сопровождающаяся потерей способности вызывать трансформацию клеток, влечет за собой выпадение из состава генома фрагмента *x* (Lai et al., 1973). Отсюда авторами делается предположение, что именно во фрагменте *x* и заключена информация, необходимая для осуществления трансформации клеток. Интересно, что анализ РНК-азных гидролизатов субъединиц *a* и *b* методом отпечатков пальцев показал значительное сходство их между собой, но в препаратах гидролизатов субъединиц *a* обнаружен дополнительный олигонуклеотид, который и мог бы быть компонентом *x*.

Следовательно, отношение между субъединицами саркоматозных и лейкозных вирусов птиц может быть выражено соотношением  $a = b + x$ . Если мы вспомним, что основное биологическое отличие этих двух вирусов заключается в том, что саркоматозные вирусы способны трансформировать фибробласты, то можно думать, что эта способность связана с геном, который локализован во фрагменте *x*.

Следовательно, в настоящее время можно говорить о том, что геном вирусов саркомы состоит из 2—4 субъединиц *a*, а геном вирусов лейкозов — из 2—4 субъединиц *b*. Мутанты саркомных вирусов, дефектные по трансформации (см. главу 3), имеют де-

лению, в геноме и, скорее всего, утрачивают фрагмент  $x$ , а размер субъединиц в таких вирусах соответствует размеру субъединиц  $b$  в лейкозных вирусах.

Таким образом, субъединицы РНК саркоматозных вирусов птиц имеют несколько большие размеры, чем субъединицы РНК лейкозных вирусов. Не исключено, что размер дополнительного фрагмента содержит в себе информацию, необходимую для осуществления трансформирующего действия вируса.

Аналогичная, но несколько иная картина имеет место для саркоматозных вирусов млекопитающих. Эти вирусы, как уже отмечалось выше, дефектны по репликации и популяция саркоматозных вирусов, содержат примесь вируса-«помощника», причем для вируса Ki-MSV количество саркоматозного вируса приблизительно в 10 раз выше, чем Ki-MuLV (Maisel et al., 1973). Оказалось, что коэффициент седиментации тотального препарата РНК Ki-MSV (MuLV) составляет 55S, а Ki-MuLV — 62S. 62S РНК MuLV после тепловой диссоциации образует субъединицы с мол. весом  $2,5 \cdot 10^6$  дальтон, а 55S РНК MSV (MuLV) — одну основную субъединицу с мол. весом  $2,3 \cdot 10^6$  и одну минорную  $2,5 \cdot 10^6$  дальтон. Количество этой субъединицы составляет около 10% от основной, поэтому можно думать, что субъединица в  $2,5 \cdot 10^6$  дальтон в препарате РНК Ki-MSV (MuLV) принадлежит MuLV. Из этих данных следует, что субъединица РНК MSV меньше субъединицы РНК MuLV как минимум на 200 000 дальтон (Maisel et al., 1973). При этом надо помнить, что в РНК MSV закодирована информация, необходимая для трансформации. Если проводить аналогии с вирусами птиц, то эта информация должна содержаться в фрагменте с минимальным мол. весом 300 000 дальтон. Отсюда следует, что для независимой репликации саркоматозного вируса Кирстен необходим как минимум дополнительный фрагмент РНК размером в 500 000 дальтон.

Интересные данные были представлены Ло и Боллом (Lo, Ball, 1974), которым удалось выделить штамм саркоматозного вируса мышей, независимого от вируса-«помощника» — MSV ( $R^+T^+$ ). При сравнении РНК этого штамма с РНК стандартного штамма MSV, т. е. ( $R^-T^+$ ), оказалось, что нативная РНК ( $R^-T^+$ ) штамма имеет мол. вес  $8 \cdot 10^6$ , а РНК ( $R^+T^+$ ) штамма —  $10 \cdot 10^6$  дальтон. Молекулярный вес РНК MuLV в этих экспериментах также составлял  $10 \cdot 10^6$  дальтон. Размер субъединицы РНК ( $R^+T^+$ ) определен в  $4,7 \cdot 10^6$ , в то время как субъединицы РНК ( $R^-T^+$ ) в  $3,4 \cdot 10^6$  дальтон. Таким образом, эти данные находятся в соответствии с предположениями, о которых говорилось выше. Характерно, что в клетках, зараженных MSV (MuLV), обнаруживались вирусспецифические РНК с коэффициентами седиментации 35S и 30S, соответствующие РНК лейкозного и саркоматозного вирусов (Tsuchida et al., 1974c). Таким образом, обобщая

данные о субъединицах РНК в онкорнавирусах птиц и млекопитающих, можно, по-видимому, сделать следующие общие выводы:

1) РНК саркоматозного вируса (способного как к трансформации, так и к репликации), кроме генов, ответственных за синтез структурных компонентов вириона, по-видимому, содержит в своем составе еще два «принципиальных» гена — ген «трансформации» и ген «репликации»;

2) в РНК лейкозных вирусов и вирусов, дефектных по трансформации, отсутствует ген трансформации, причем, по-видимому, в лейкозных вирусах его просто нет, а в *td*-вирусах происходит делеция части генома;

3) в РНК саркоматозных вирусов, дефектных по репликации, этот ген присутствует, но происходит делеция другой части генетического материала — гена репликации.

По-видимому, существуют формы вирусов, которые содержат (в случае недефектных вирусов сарком) оба типа субъединиц (Stone et al., 1974).

Итак, если каждая субъединица РНК имеет одинаковые концевые последовательности и одинаковые размеры, то, по-видимому, при дальнейшем изучении высокомолекулярной РНК онкорнавирусов наибольший интерес представляет вопрос о том, идентичны ли субъединицы РНК каждого вируса в генетическом плане? Если субъединицы идентичны, то такой геном является полиплоидным, а если нет и каждая субъединица РНК несет собственную генетическую информацию, то такой геном является гаплоидным.

В настоящее время используются два подхода для определения субъединиц по последовательности нуклеотидов [или «композиционной сложности» (sequence complexity)]. Первый метод основан на определении кинетики ренатурации меченой вирусспецифической ДНК, синтезированной *in vitro* с помощью обратной транскриптазы, с избытком вирусной РНК (см. ниже). В этом случае кинетика образования двуниевых комплексов находится в зависимости от длины и состава субъединиц РНК и, соответственно, имеет разный характер.

Второй метод основан на измерении молярного количества олигонуклеотидов, полученных при гидролизе РНК-азой T1 высокомолекулярной РНК.

Данные, полученные первым методом, свидетельствуют о том, что геном вирусов MuLV, RSV и висна является гаплоидным, т. е. субъединицы в генетическом отношении различны (Fan, Paskind, 1974; Haase et al., 1974; Taylor et al., 1974).

В то же время данные по изучению РНК-азных гидролизатов свидетельствуют об обратном, т. е. что геном онкорнавирусов (во всех случаях исследовали RSV) полиплоиден и субъединицы



идентичны (Billeter et al., 1974; Beemon et al., 1974; Quade et al., 1974b).

Подробно вопрос о полиплоидности или гаплоидности генома онкорнавирусов рассмотрен Фогтом (Vogt, 1973) и, по-видимому, полиплоидная модель более отвечает тем экспериментальным данным, в основном генетическим, которые получены при изучении биологии этих вирусов и рассмотрены нами в главе 3.

Для субъединиц вирусной РНК остается еще несколько нерешенных проблем, в том числе такая: зачем 35—37S РНК субъединицам объединяться между собой с образованием 60—70S молекул, если сами субъединицы несут в себе всю необходимую генетическую информацию?

Ченг и др. (Cheung et al., 1972), сравнивая РНК из вирионов сразу же после выхода из клеток («быстрый урожай») с РНК через несколько часов после выхода, обнаружили, что РНК из вирионов «быстрого урожая» в основном представлена 35—37S компонентом, а РНК из популяции вирионов при длительной инкубации в среде представлена 70S компонентом. Таким образом, 70S РНК образуется уже в составе вириона, а 35S РНК является предшественником высокомолекулярной РНК. Такие же данные получены Канани и др. (Canaani et al., 1973) на вирусе Рауса, Истом и др. на модели вируса MSV (East et al., 1973a) и Букринской и др. (Bukrinskaya et al., 1974) на модели Мэзон-Пфайцер подобного вируса из перевиваемых клеток человека. Как проходит «созревание» 70S РНК из 35—37S РНК в составе вириона, неясно, но кажется маловероятным простое физическое взаимодействие субъединиц, и можно предполагать, что этот процесс осуществляется за счет каких-то ферментных систем вириона. Было также показано, что в процессе формирования 60—70S РНК происходит постепенная структурная перестройка РНК (East et al., 1973a). При окончательном формировании молекулы вирусной РНК из субъединиц происходит частичное перекрывание молекул субъединиц с образованием двунитчатых участков (Travnicek et al., 1973). Кроме того, не исключено, что в поддержании структуры 60—70S РНК участвуют низкомолекулярные РНК вириона (Haase et al., 1974a, b).

Созревание РНК в составе вириона, трудно понять с биологической точки зрения, но тем не менее это представляет значительный интерес прежде всего благодаря своей уникальности.

Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют о том, что необходимые генетические функции закодированы в составе 35—37S субъединиц. Но если эта генетическая информация, прежде чем интегрировать в геном, должна предварительно транскрибироваться в ДНК, то необходимо иметь данные о способности РНК к транскрибированию. Оказалось, что 60—70S РНК спо-

собна транскрибироваться в ДНК (Sanaani, Duesberg, 1973), но очищенные субъединицы такой способностью не обладали. Однако введение в систему с 35—37S субъединицами низкомолекулярной РНК стимулировало синтез ДНК. Эти данные, с одной стороны, свидетельствовали о способности вирусного генома к транскрипции, а с другой стороны, о важной роли фракции низкомолекулярной РНК.

*Другие виды РНК  
в составе вирусной частицы*

Как уже указывалось выше, в составе тотальной вирусной РНК, выделяемой из вирусной частицы, кроме 60—70S РНК, обнаруживается значительное количество гетерогенной РНК с коэффициентом седиментации 4—30S. При исследовании этой фракции РНК было обнаружено, что в ней присутствует примесь 28S и 18S рибосомальных РНК хозяина (Obara et al., 1974; Larsen et al., 1972), 7—9S РНК (Bishop et al., 1970; Larsen et al., 1973) и 4S РНК. Функции 7—9S РНК остаются неясными (Erikson, Erikson, 1973), а функции 4S РНК представляют значительный интерес.

Многочисленные исследования, связанные с изучением фракции 4S РНК, позволяют в настоящее время сделать следующее заключение. 4S РНК представляет собой гетерогенную популяцию молекул низкомолекулярной РНК (Sawyer, Dahlberg, 1973), состоящую из продуктов деградации высокомолекулярной вирионной РНК (Robinson, Baluda, 1965), из примеси транспортной РНК клетки (Wollman, Kirsten, 1968; Randerath et al., 1971), из собственно вирусной транспортной РНК (Travnicek, Riman, 1970; Randerath et al., 1971; Elder, Smith, 1973, Wang et al., 1973) и молекул низкомолекулярной РНК, выполняющей функцию затравки в синтезе ДНК-копии на матрице вирионной РНК (Sanaani, Duesberg, 1973).

Присутствие примеси клеточной РНК в вирусе вполне объяснимо, поскольку созревание вириона происходит на мембранах клетки, и естественно, что в процессе сборки вирусной частицы может происходить неспецифический захват клеточного материала.

Таким образом, среди низкомолекулярных РНК можно выделить два вида вирусспецифических молекул — собственно транспортную РНК вириона и РНК, выполняющую функцию затравки в ДНК-полимеразной реакции. Не исключено также, что какая-либо из транспортных РНК может выполнять функцию затравки. В последнее время появились данные, что в случае вируса миелобластоза птиц эту функцию выполняет транспортная РНК, специфичная для триптофана и кодируемая геномом клетки, т. е. яв-

ляющаяся для вируса примесью в прямом смысле (Dahlberg et al., 1974).

Спектр транспортных РНК в основном определяется геномом вируса, поскольку разные онкорнавирусы, птиц, культивируемые на одних и тех же клетках, имеют разный спектр РНК. Если это так, то можно предположить, что специфичность узнавания белков в процессе их синтеза может происходить уже на стадии взаимодействия аминокислоты со специфической транспортной РНК. Кроме того, в вирионах присутствует тРНК-синтетазная активность, осуществляющая активирование аминокислот (Erikson, 1972; Travnicek, Riman, 1973).

Кроме так называемой свободной низкомолекулярной РНК, отделяемой от высокомолекулярной РНК при экстракции, в препаратах обнаруживается также «ассоциированная» низкомолекулярная РНК (Rosenthal, Zamechnik, 1973). Эта РНК обнаруживается только при тепловой диссоциации 60—70S РНК. В популяции молекул этой ассоциированной РНК обнаруживаются те же типы низкомолекулярной вирусспецифической РНК, что и в составе свободной низкомолекулярной РНК. Однако можно думать, что функции этих РНК в основном сводятся к инициации синтеза ДНК и к поддержанию специфической конфигурации 60—70S РНК (Emanoil-Ravicovitch et al., 1973; Nichols, Waddell, 1973).

Наличие низкомолекулярной РНК-затравки в тесной ассоциации с высокомолекулярной РНК можно считать твердо доказанным (Faras et al., 1974a; Dahlberg et al., 1974b).

#### ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПТАЗА ОНКОРНАВИРУСОВ

В предыдущей главе были рассмотрены данные, свидетельствующие о том, что высокомолекулярная РНК онкорнавирусов имеет по крайней мере несколько групп генов, необходимых соответственно для репликации, трансформации и синтеза структурных белков вириона.

Каким же образом может осуществляться передача информации вирусного потомства? Принципиально для РНК-содержащих вирусов существуют два пути репликации генома — классический путь, характерный для инфекционных вирусов, содержащих однонитевую РНК и заключающийся в синтезе двухспиральной репликативной формы РНК, и второй путь — тоже через промежуточную форму, но уже в виде ДНК.

Второй путь был впервые предложен Темным (Temin, 1964a, b) на основании собственных экспериментальных данных по исследованию репродукции вируса саркомы Рауса.

Оба пути требовали присутствия специфических ферментов — в первом случае РНК-зависимой РНК-полимеразы и во втором —

РНК-зависимой ДНК-полимеразы. Такие ферменты могли быть локализованы как в вирусной частице, так и в клетке.

Многочисленные исследования, проведенные на модели инфекционных РНК-содержащих вирусов, свидетельствовали о том, что фермент РНК-зависимая РНК-полимераза действительно обнаруживается либо в ассоциации с вирионами, либо в зараженных клетках. В то же время этот фермент не выявлялся в системе с онкорнавирусами (см. Киселев, 1973).

Предположение о существовании ДНК-полимеразы в вирионе нашло экспериментальное подтверждение в работах Темина и Мизутани (Temin, Mizutani, 1970) и Балтимора (Baltimore, 1970), которые обнаружили РНК-зависимую ДНК-полимеразную активность в частицах вируса саркомы Рауса и вируса лейкемии Раушера. Эти данные были вскоре подтверждены в других лабораториях (Spiegelman et al., 1970a; Green et al., 1970).

Открытие РНК-зависимой ДНК-полимеразной активности показало принципиальную возможность синтеза ДНК на матрице РНК. А это означало, что в процессе репродукции онкорнавирусов действительно мог проходить синтез ДНК-провируса и, как следствие этого, последующее включение ДНК в геном клетки хозяина. Таким образом, основное отличие интеграции РНК-содержащих онкогенных вирусов от ДНК-содержащих заключается в том, что у онкорнавирусов сначала происходит синтез ДНК-копии с РНК-генома с помощью фермента, локализованного в составе вирусной частицы. Можно предполагать, что последующие этапы, т. е. транскрипция с интегрированного генома, имеют такой же характер для обеих групп указанных вирусов.

Следует подчеркнуть, что принципиальную возможность обратной транскрипции предсказал С. М. Гершензон еще до появления работ Темина на основании опытов по изучению репродукции вируса (см. Гершензон, 1972).

Таким образом, открытие обратных транскриптаз имело большое значение не только для понимания механизмов репродукции онкорнавирусов, но и создавало возможности для разрешения важных общепаразитических вопросов:

1. Возможность передачи генетической информации с РНК на ДНК и роль такого пути передачи информации в приобретении клеткой новых наследственно закрепленных свойств. Этому посвящена последняя теория Темина, получившая название прото-вирусной (Temin, 1971).

2. Использование очищенной обратной транскриптазы для копирования индивидуальных информационных РНК, благодаря чему открылись широкие перспективы синтеза гена *in vitro*; в свою очередь эти исследования повлекли за собой углубленное изучение и других клеточных ферментов, осуществляющих полимеризацию нуклеиновых кислот.



3. Использование синтезированных *in vitro* ДНК-копий для изучения экспрессии синтеза как вирусспецифических, так и клеточных информационных РНК.

В настоящее время в большинстве изученных онкорнавирусов обнаружена РНК-зависимая ДНК-полимеразная активность. Эта активность обнаружена в вирусах птиц [вирусы саркомы (Duesberg, Canaan, 1970; Temin, Mizutani, 1970; Baltimore, 1970; Garapin et al., 1970; Spiegelman et al., 1970), миелобластома (Garapin et al., 1970), лейкоза (Riman, Beaudreau, 1970), ретикулоэндотелиоза (Peterson et al., 1972)], мышей [вирусы лейкоза (Baltimore, 1970; Spiegelman et al., 1970; Scolnick et al., 1970; Hatanaka et al., 1970), лейкозно-саркоматозного комплекса (Spiegelman et al., 1970; Scolnick et al., 1970; Green et al., 1970; Rokutanda et al., 1970), карциномы молочной железы (Spiegelman et al., 1970; Scolnick et al., 1970; Dickson, 1973)], кошек [вирусы лейкоза (Spiegelman et al., 1970; Scolnick et al., 1970; Hatanaka et al., 1970), саркомы (Scolnick et al., 1970; Hatanaka et al., 1970), RD114 (McAllister et al., 1972)], хомяков (Hatanaka et al., 1970), приматов [вирусы лимфомы гиббонов (Kawakami et al., 1972), карциномы молочных желез Мэзон-Пфайцера (Chopra, Mason, 1970; Schlom, Spiegelman, 1971b), саркомы обезьян (Theilen et al., 1971; Wolfer et al., 1971), эндогенный вирус приматов M7 (Todaro et al., 1974a)].

Кроме этих вирусов, онкогенные потенции которых доказаны, обратная транскриптаза обнаружена также в ассоциации с некоторыми вирусами и частицами, онкогенная активность которых пока не установлена. К ним относятся пенящийся вирус обезьян (foamy) (Parks et al., 1971), вирусоподобные частицы из молока человека (Moore et al., 1971; Schlom et al., 1971a; Das et al., 1972), вирус змей (Hatanaka et al., 1970; Twardzik et al., 1974), вирус висна (Spiegelman et al., 1970; Schlom et al., 1971b), частицы из лейкозных тканей человека (Gallo et al., 1970).

Поскольку обратная транскриптаза обнаружена в вирусных частицах, не обладающих онкогенными потенциями, можно предполагать, что интеграционные отношения не являются исключительной принадлежностью онкорнавирусов. Возможно, что «медленные» инфекции и некоторые другие формы вирусных инфекций имеют в своей основе подобный механизм взаимодействия с клеткой (см. Ирлин и др., 1973).

#### *Вирусная обратная транскриптаза*

Прежде чем переходить к вопросу о вирусной обратной транскриптазе, мы хотели бы рассмотреть некоторые общие вопросы, связанные с синтезом ДНК.

Под термином вирусная обратная транскриптаза мы будем подразумевать комплекс двух типов ферментативных ДНК-полимеразных активностей — РНК-зависимой и ДНК-зависимой. Первый тип этой активности — РНК-зависимая ДНК-полимераза, или ревертаза, — специфический для онкорнавирусов и осуществляет синтез на матрице вирионной РНК.

Как и всякий фермент, осуществляющий полимеризацию нуклеотидов, обратная транскриптаза требует присутствия в полимеразной смеси некоторых необходимых компонентов. Это прежде всего матрица. Следует различать три вида матриц, используемых в данной системе: 1) эндогенная матрица — этот термин применяется только в том случае, если в качестве фермента используется разрушенный онкорнавирус и матрицей служит вирионная высокомолекулярная РНК; 2) экзогенная синтетическая матрица — термин применяется в отношении синтетических рибонили дезоксирибополимеров (типа полиА или поли дА) или гибридных синтетических молекул (типа поли А: поли дТ) (сополимер полирибоадениловой и полидезоксирiboадениловой кислот), способных функционировать в качестве матрицы как в системе с разрушенным вирусом, так и в системе с очищенным ферментом; 3) природная экзогенная матрица — термин применяется в отношении индивидуальных информационных РНК, транскрибируемых, как правило, в системе с очищенным ферментом.

Затравка — второй необходимый ингредиент полимеразной реакции. Сейчас можно считать твердо установленным, что синтез ДНК как на матрице ДНК, так и на матрице РНК инициируется с помощью короткого полинуклеотидного фрагмента, к которому затем ковалентно присоединяются полимеризующиеся дезоксирибонуклеотиды (Sugino, Okazaki, 1973). В случае эндогенного синтеза роль затравки, по-видимому, выполняют низкомолекулярные РНК, ассоциированные с 60—70S РНК (Duesberg et al., 1971), в системе с очищенным ферментом — олигонуклеотиды типа олиго дТ или олиго дГ (Spiegelman et al., 1971).

Поскольку синтез с помощью обратной транскриптазы осуществляется на матрице РНК, то он чувствителен к РНК-азе — одно из основных отличий РНК-зависимого синтеза от ДНК-зависимого (Spiegelman et al., 1970b). Однако этот тест не является абсолютным критерием, поскольку некоторые клетки животных содержат эндогенную ДНК-полимеразную активность, чувствительную к РНК-азе, которая, как оказалось, инициируется РНК, но направляется ДНК (Bobrow et al., 1972). Поэтому для доказательства истинности РНК-зависимой ДНК-полимеразной активности необходимо проведение двух типов контрольных экспериментов: выделение из полимеразной системы РНК: ДНК гибридов и способность  $^3\text{H}$ -ДНК-продукта гибридизироваться с РНК-матрицей (Hatanaka et al., 1971).

Вирусная полимеразная активность обнаруживается, как правило, в ассоциации с частицами, имеющими плотность 1,16—1,18 г/мл. При обработке вирионов неионными детергентами типа тритон X100 или NP40 ферментативная активность выявляется в зоне с плотностью 1,22—1,24 г/мл, где обнаруживаются нуклеоид вируса, содержащий фермент и 70S РНК (Coffin, Temin, 1971a; Robinson, Robinson, 1971). Для каждого типа вируса существует строго определенная концентрация детергента, необходимая для образования нуклеоидов. Высокие концентрации детергентов разрушают нуклеоиды, и при этом освобождается ДНК-полимеразная активность, тестируемая с помощью экзогенной матрицы, которая обнаруживается в градиенте сахарозы в зоне с плотностью 1,1 г/мл (Gerwin et al., 1970; Coffin, Temin, 1971a; Robinson, Robinson, 1971).

**Условия реакции.** Эндогенная реакция требует присутствия тритона X100 или NP40. Для вирусов млекопитающих оптимальная концентрация тритона составляет 0,01% (Baltimore, 1970). При более высоких концентрациях наблюдается ингибирование реакции, и практически вся активность исчезает при концентрации 0,05%. Для вирусов птиц требуется большая концентрация детергентов (0,1—0,2% NP40), и уровень этой активности мало изменяется при увеличении концентрации NP40 (Garapin et al., 1970; Baltimore, 1970). Эти данные подтверждают предположение о том, что фермент ассоциирован с нуклеоидом вируса и его РНК.

Второй необходимый компонент реакции — все четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата, которые не могут быть заменены рибонуклеозидтрифосфатами (Temin, Mizutani, 1970; Baltimore, 1970; Garapin et al., 1970; Spiegelman et al., 1970; Kiessling, Neiman, 1972).

Двухвалентные катионы ( $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ ) необходимы для проявления максимальной активности. Оптимум концентрации для  $Mg^{2+}$  лежит в пределах 5—10 мМ, а для  $Mn^{2+}$  — 0,5—2 мМ (Temin, Mizutani, 1970; Baltimore, 1970; Spiegelman et al., 1970; Faras et al., 1971). Присутствие моновалентных катионов не является необходимым, но при низких концентрациях (20—30 мМ) наблюдается незначительная стимуляция эндогенного синтеза. При более высоких концентрациях моновалентных катионов происходит ингибирование реакции. Ионы  $Mn^{2+}$  эффективнее стимулируют активность вирусов млекопитающих, а ионы  $Mg^{2+}$  — вирусов птиц. Присутствие дитиотреитола или  $\beta$ -меркаптоэтанола необходимо для эндогенной ДНК-полимеразной системы. Оптимум pH — в пределах 8, а оптимум температуры — около 40° (Temin, Mizutani, 1970; Baltimore, 1970; Spiegelman et al., 1970).

**Чувствительность к рибонуклеазе.** Эндогенная ДНК-полимеразная активность вирионов ингибируется после предварительной инкубации вируса, обработанного детергентами, с панкреатиче-

ской рибонуклеазой (в пределах 5—100 мкг/мл). Как правило, наилучшими условиями этой реакции являются низкие концентрации РНК-азы (5—20 мкг/мл) в присутствии соли (менее 0,2 мМ). Чувствительность эндогенной реакции к РНК-азе является первым доказательством того, что вирусная 70S РНК участвует в синтезе ДНК и направляет этот синтез (Spiegelman et al., 1970).

**Природа эндогенного продукта.** При анализе раннего эндогенного продукта (20 мин. синтеза) обнаружено, что он представляет собой ДНК, ассоциированную с 60—70S вирионной РНК. Плавающая плотность таких компонентов в градиенте  $Cs_2SO_4$  составляет 1,66 г/мл, что характерно для РНК. Весьма незначительное количество продукта обнаруживается в зоне с плотностью 1,42—1,44 г/мл, характерной для ДНК. При обработке таких комплексов щелочью происходит деградация РНК, а остающаяся ДНК обладает константой седиментации от 4 до 10S (Garapin et al., 1970; Spiegelman et al., 1970; Rokutanda et al., 1970; Manly et al., 1971).

При отжиге эндогенного ДНК-продукта с вирусной РНК (Spiegelman et al., 1970; Duesberg, Sanaani, 1970; Hatanaka et al., 1970; Rokutanda et al., 1970; Theilen et al., 1971; Coffin, Темин, 1971a, 1972) с последующим анализом в градиенте  $Cs_2SO_4$  часть радиоактивной ДНК обнаруживается в зоне с плотностью, характерной для РНК ( $\rho = 1,66$  г/мл), и часть в зоне, характерной для ДНК: РНК гибридов ( $\rho = 1,55$  г/мл).

Анализ продукта длительного синтеза (60 мин.) показывает, что основная его масса представлена двунитевой ДНК с той же константой седиментации, т. е. в процессе синтеза не происходит удлинения синтезируемой ДНК (Garapin et al., 1970; Spiegelman et al., 1970; Mizutani et al., 1970; Faras et al., 1971; Fujinaga et al., 1970). И на поздних, и на ранних стадиях реакции среди продуктов синтеза можно выделить три группы продуктов: гибриды ДНК: РНК, однонитевую ДНК и двунитевую ДНК. На ранних стадиях преобладают два первых типа продуктов, на поздних — двунитевая ДНК (Manly et al., 1971). Эти данные свидетельствуют о том, что фермент (обратная транскриптаза) имеет две функционально активные детерминанты — одну, осуществляющую синтез ДНК на матрице РНК, и вторую, осуществляющую синтез двунитевой ДНК (Manly et al., 1971; Fanshier et al., 1971). Эти две детерминанты могут быть локализованы как на одной белковой молекуле, так и быть разобщенными. Однако, по-видимому, обе ферментативные активности связаны с одной и той же белковой субъединицей фермента (Grandgenett et al., 1973).

Особого внимания заслуживает вопрос о размере синтезируемой ДНК — всего 8—10S, что соответствует молекулярному весу 80 000—100 000 дальтон. Причин малого размера может быть не-



скольким: во-первых, присутствие в препаратах вируса нуклеаз, вызывающих деградацию синтезируемой ДНК (Mizutani et al., 1970); во-вторых, дефектность системы, заключающейся в том, что условия, используемые для синтеза, не являются оптимальными; в-третьих, возможно, что синтез такого типа является истинным и синтезируемые фрагменты ДНК могут быть лишь промежуточным продуктом и связываться затем с помощью ДНК-лигазы в про-вирусную ДНК (Mizutani et al., 1971; Hurwitz, Leis, 1972).

Обнаружение в последнее время в клетках, зараженных онкорнавирусами, полной копии вирусного генома в виде двунитевой ДНК с молекулярным весом  $6,0 \cdot 10^6$  дальтон (Ali, Baluda, 1974) свидетельствует о том, что *in vitro* действительно происходит «дефектный» синтез. Можно также предполагать, что при транскрипции вирусного генома в клетке в этот процесс вовлекаются какие-то клеточные компоненты, способствующие полной и непрерывной транскрипции вирусного генома.

Особого внимания заслуживает вопрос о транскрипции РНК в «эндогенной» реакции. Этот вопрос имеет большое значение, поскольку синтезируемую *in vitro* ДНК используют для выявления вирусспецифических нуклеотидных последовательностей в клетках.

В своей ранней работе Дусберг и Канани (Duesberg, Canani, 1970) показали, что синтезируемый *in vitro* набор молекул низкомолекулярной ДНК составляет в сумме полную копию вирусного генома, что тестировалось по устойчивости гибрида ДНК-продукта с меченой вирионной РНК к РНК-азе в средах высокой ионной силы. С другой стороны, методом кинетики реассоциации двунитевого ДНК-продукта вируса лейкеза мышей и вируса саркомы Рауса было показано, что в этих препаратах ДНК имеются две основные фракции: быстро и медленно реассоциирующиеся. При этом основная масса синтезируемого продукта транскрибируется только с ограниченного участка генома (около 5%) (Gelb et al., 1971; Varmus et al., 1971).

Это ставило под сомнение правомерность использования  $^3\text{H}$ -ДНК-продукта для выявления вирусных последовательностей в клетках. Выход из этого положения был найден в опытах с актиномицином (McDonnell et al., 1970). Этот антибиотик, как известно, подавляет синтез РНК на дезоксирибополимерах. В системе с обратной транскриптазой актиномицин Д не влияет на синтез ДНК на РНК-матрице, но подавляет протекание второй реакции — синтез двунитевой ДНК. Таким образом, в системе с актиномицином Д происходит синтез только одонитевой ДНК, что и подтвердилось в опытах с нуклеазами, специфичными для одонитевых полинуклеотидов (Rabin et al., 1968).

Оказалось, что одонитевой ДНК-продукт представляет собой набор молекул, которые при гибридизации полностью комплекси-

руются с матрицей, т. е. с 60—70S вирионной РНК (Gararin et al., 1973). Это означает, что синтезируемая *in vitro* однонитчатая ДНК, или, точнее, набор молекул однонитчатой ДНК, представляет собой полную копию вирусного генома. При подборе оптимальных условий синтез  $^3\text{H}$ -ДНК-продукта может продолжаться в течение весьма длительного времени (иногда до трех суток), и при этом удается добиться выхода продукта в микрограммах (East et al., 1973b).

Не следует также думать, что все онкорнавирусы имеют «стандартные» обратные транскриптазы. По-видимому, существует в настоящее время несколько вирусов, в которых обратная транскриптаза имеет ряд аномальных свойств: А-тип интрацистернальных частиц, в которых фермент осуществляет в основном синтез политимидиловой кислоты (Wilson, Kuff, 1972); вирус саркомы мышей, выращиваемый в клетках крыс линии 78A1, полимеразы которого синтезирует только однонитчатую ДНК (Tavitian et al., 1974), вирус лейкоза хомяков, имеющий более крупную по размерам полимеразу, не способную копировать собственную 60—70S РНК (Verma et al., 1974a) и вирус С-типа из спонтанной лимфосаркомы мышей СС57Вг, фермент которого синтезирует лишь гибриды ДНК:РНК (Ловенецкий и др. 1974). Природа всех этих дефектов полимеразной активности пока остается не ясной.

#### *Очищенная обратная транскриптаза*

В настоящее время обратная транскриптаза выделена и очищена из вирусов миелобластома (Kacian et al., 1971; Hurwitz, Leis, 1972; Grandgenett et al., 1973), саркомы Рауса (Duesberg et al., 1971b; Faras et al., 1972), лейкемии Раушера (Aronson et al., 1971b; Leis, Hurwitz, 1972a), саркомы обезьян (Abrell, Gallo, 1973) и вируса Мэзон-Пфайцера (Abrell, Gallo, 1973) и вируса В-типа мышей (Dion et al., 1974).

Для выделения фермента вирус обычно солибилизируют неионными детергентами в средах высокой ионной силы и очищают путем комбинации осаждения сульфатом аммония, ионнообменной хроматографии, гельфильтрации и центрифугирования в градиенте глицерина. Уровень очистки различных вирусных ферментов находился в пределах 50—1000 раз с выходом от 1 до 10% (Duesberg et al., 1971; Kacian et al., 1971; Hurwitz, Leis, 1972; Leis, Hurwitz, 1972a, b; Faras et al., 1972; Grandgenett et al., 1973; Abrell, Gallo, 1973).

Очищенная обратная транскриптаза, выделенная из указанных выше вирусов, обладала как РНК-зависимой, так и ДНК-зависимой ДНК-полимеразной активностью (Gallo, 1971; Temin, Baltimore, 1972).

Вирусная 70S РНК эффективно транскрибируется обратной транскриптазой из вирусов птиц, но с ферментом из вирусов млекопитающих уровень транскрипции значительно ниже в отсутствие экзогенной синтетической заправки (Duesberg et al., 1971; Kacian et al., 1971; Faras et al., 1972; Hurwitz, Leis, 1972; Leis, Hurwitz, 1972; Abrell, Gallo, 1973; Grandgenett et al., 1973). Причины меньшего уровня транскрипции для вирусов млекопитающих остаются не ясными.

Молекулярный вес полимеразы из AMV был определен в 110 000 дальтон (Kacian et al., 1971) или в 160 000 дальтон (Hurwitz, Leis, 1972; Grandgenett et al., 1973). Этот фермент состоит из двух полипептидных цепей —  $\alpha$  и  $\beta$ . Цепь  $\alpha$  имеет мол. вес 65 000—70 000, а  $\beta$ -цепь — 110 000—120 000 дальтон (Kacian et al., 1971; Grandgenett et al., 1973). Очищенный фермент из вируса саркомы Рауса также содержит две субъединицы с молекулярным весом 65 000 и 105 000 дальтон (Faras et al., 1974). Фермент из вируса Раушера, по данным гельфильтрации, имеет молекулярный вес 70 000 дальтон (Ross et al., 1971), а по данным центрифугирования в градиенте глицерина — 90 000 дальтон (Hurwitz, Leis, 1972).

Ферменты из вирусов саркомы шерстистых обезьян и Мэзон-Пфайцера обладали средним молекулярным весом 70 000 дальтон и 120 000 дальтон соответственно. Оба эти фермента содержали лишь одну субъединицу (Abrell, Gallo, 1973).

Транскриптаза из вируса MTV имеет мол. вес 95 000—98 000 дальтон (Dion et al., 1974).

Из приведенных выше данных следует, что меньшая субъединица вирусного фермента обладает обоими видами активности, и можно предполагать, что в случае вирусов птиц большая субъединица несет какую-то вспомогательную функцию.

Количество молекул фермента на вирион RSV составляет 2—5 (Faras et al., 1972), а на вирион AMV — 5—17 (Kacian et al., 1971).

#### *Иммунологические характеристики вирусной обратной транскриптазы*

Антитела, полученные против обратных транскриптаз из вирусов птиц, млекопитающих и приматов, обнаружили весьма характерную специфичность. Антитела против обратной транскриптазы вирусов AMV и RSV (Nowinski et al., 1972a; Watson et al., 1972; Parks et al., 1972a) специфически ингибируют ферментативную активность вирусов С-типа птиц, но не ингибируют полимеразу онкорнавирусов кошек, крыс, хомячков и мышей.

Антитела против фермента из вируса кошек подавляют обратнотранскриптазную активность лейкозных и саркоматозных виру-

сов мышей, кошек и вируса лейкоза хомячков (Aaronson et al., 1971b). Эти данные свидетельствуют об иммунологическом родстве обратных транскриптаз у вирусов С-типа млекопитающих. Но эти же антисыворотки не влияют на активность полимеразы вирусов птиц и вируса опухолей молочных желез мышей и вируса С-типа обезьян (Aaronson et al., 1971b).

Таким образом, обратные транскриптазы онкорнавирусов обладают видовой и межвидовой антигенностью (Scolnick et al., 1972d).

Получены также антитела к обратной транскриптазе вирусов приматов (Scolnick et al., 1972a). Эти антитела ингибировали только ферментативную активность вирусов приматов и вирусоподобных частиц, выделенных из крови людей, больных лейкозом (Todaro, Gallo, 1973; Gallagher et al., 1974). В то же время фермент из вируса Мэзон-Пфайцера (вирус В-типа) этой антисывороткой не ингибировался.

В последнее время из плаценты обезьян выделен эндогенный вирус С-типа (вирус М7), ферментативная активность которого не подавлялась антисывороткой к обратной транскриптазе вирусов гиббонов и шерстистых обезьян, но ингибировалась антисывороткой к ферменту из вируса RD-114 (Long et al., 1973; Todaro et al., 1974a, b). На основании этого можно сделать вывод об известном биологическом родстве между эндогенными вирусами млекопитающих.

Вирусы лейкозно-саркоматозного комплекса птиц и вирусы группы ретикулоэндотелиоза птиц, по данным молекулярной гибридизации, неродственны (см. выше), и первоначально было показано, что иммунологически обратные транскриптазы этих вирусов отличны одна от другой (Mizutani, Temin, 1973). Однако позднее эти же авторы (Mizutani, Temin, 1974), используя более чувствительный радиоиммунологический тест, показали, что обратные транскриптазы этих вирусов имеют определенное антигенное сходство. Удивительно, что перекрестные иммунологические реакции обнаруживались и с клеточными ДНК-полимеразами. Это дало возможность авторам высказать предположение, что обратные транскриптазы обеих групп онкорнавирусов птиц имеют клеточное происхождение.

#### *Матрицы-затравки в обратнотранскриптной реакции*

Обратная транскриптаза вирусов AMV и RSV способна использовать вирусную 70S РНК как матрицу-затравку (т. е. без добавления синтетической затравки типа олиго-(дТ) с большей эффективностью, чем любой другой тип природных РНК (Duesberg et al., 1971; Goodman, Spiegelman, 1971; Spiegelman et al., 1971; Faras



et al., 1972; Leis, Hurwitz, 1972). Полимераза AMV способна также транскрибировать РНК вирусов лейкоза мышей и хомячков (Spiegelman et al., 1971). Следовательно, у вирусной полимеразы отсутствует специфичность при использовании вирусных высокомолекулярных РНК. Размер синтезируемого ДНК-продукта был в пределах 4—6S (Spiegelman et al., 1971; Leis, Hurwitz, 1972; Duesberg et al., 1971; Faras et al., 1972; Goodman, Spiegelman, 1971).

Олигонуклеотиды типа олиго (дТ), олиго (дГ) и олиго (дЦ) стимулируют обратнотранскриптазную реакцию в 5—20 раз (Duesberg et al., 1971; Gallo, 1971; Robert et al., 1972; Temin, Baltimore, 1972; Abrell, Gallo, 1973). Стимуляция с помощью олиго (дТ), по-видимому, связана с затравочным эффектом олиго (дТ) на полиА фрагмент, присутствующий во всех РНК онкорнавирусов.

Начальным продуктом реакции является гибрид ДНК:РНК, в котором РНК ковалентно связана с ДНК (Leis, Hurwitz, 1972a, b; Verma et al., 1971). Это вытекает из данных о переносе  $P^{32}$  из  $\alpha$ -положения дезокситрифосфата в рибонуклеозидмонофосфат. Доминирующим переносом в этой реакции был перенос из дА в рА, т. е. образование ковалентной связи по типу фАф (дА)ф... (Verma et al., 1972; Flugel et al., 1972).

#### *Информационная РНК в качестве матрицы*

В качестве матрицы для обратной транскриптазы вируса птиц способна функционировать и 9S информационная РНК из ретикулоцитов кролика (см. Sarin, Gallo, 1973). Эта реакция полностью зависит от олигонуклеотидной затравки. Синтезируемый продукт имеет сравнительно высокий молекулярный вес (коэффициент седиментации около 8S), что свидетельствует о том, что фермент *in vitro* способен считывать длинные последовательности в РНК, по-видимому, осуществляя синтез структурной части гена. Причины, по которым ДНК-продукт при использовании 70S РНК-матрицы имеет размеры 4—6S, остаются неясными. По-видимому, это может быть связано с двумя обстоятельствами: различием в конформации 70S РНК и 9S глобиновой РНК и большей чувствительностью 70S РНК к контаминирующим нуклеазам.

Эффективной матрицей для обратной транскриптазы оказались информационная РНК, специфичная для вируса вакцина, иммуноглобулиновая РНК, выделенная из плазмцитомы мышей BALB (см. Sarin, Gallo, 1972) и ряд других природных РНК. Во всех случаях для проведения реакции необходимо было присутствие олиго (дТ).

*Синтетические РНК и ДНК  
как матрицы-затравки*

Дезокси- или рибополимеры типа полиА, полиУ, полиЦ, полиГ, поли(дТ), поли(дА), поли(дЦ) и поли(дГ) не способны функционировать в качестве матрицы для вирусной ДНК-полимеразы в отсутствие экзогенной затравки (Baltimore, Smoler, 1971; Gallo, 1971; Coodman, Spiegelman, 1971; Hurwitz, Leis, 1972; Leis, Hurwitz, 1972a, b; Robert et al., 1972; Temin, Baltimore, 1972; Wells et al., 1972).

Гибридные полимеры РНК:ДНК способны функционировать в качестве матрицы для вирусной ДНК-полимеразы. Наиболее эффективным является полимер поли(дТ:рА) (Spiegelman et al., 1970; Baltimore, Smoler, 1971). Замена поли(дТ) на (дТ<sub>12-18</sub>) еще более увеличивает эффективность синтеза. Продуктом синтеза на матрице олиго(дТ):поли(рА) является поли(дТ). Молекула затравки (в данном случае олиго(дТ) включается в состав продукта, и синтез начинается на 3'-ОН конце затравки (Temin, Baltimore, 1972; Hurwitz, Leis, 1972; Flügel, Wells, 1972; Flügel et al., 1973).

Весьма важным для понимания механизма функционирования вирусного фермента и возможных его отличий от клеточных полимераз является вопрос о специфичности обратной транскриптазы в отношении матриц.

Полимераза вируса АМV и вируса лейкоза Молони способна копировать полиА, полиЦ, поли(дЦ) и полиИ в присутствии соответствующих комплементарных олигомеров. Полимераза вируса лейкоза Молони способна использовать кроме того олиго(дА):полиУ (Baltimore, Smoler, 1971). Когда используются олигомерные затравки (в противоположность полимерным) все вирусные ДНК-полимеразы утилизируют рибогомополимеры в качестве матриц, в то время как ДНК-полимеразы I и II из *E. coli* (Baltimore, Smoler, 1971; Goodman, Spiegelman, 1971; Robert et al., 1972), *M. luteus* (Wells et al., 1972) тимуса теленка (Goodman, Spiegelman, 1971) и нормальных лимфоцитов человека (Robert et al., 1972; Gallo et al., 1972) отдают предпочтение дезоксиполи-нуклеотидным матрицам. Следовательно, путем комбинирования различных матриц можно различать клеточные и вирусные ферменты. Предпочтение вирусных ферментов в отношении олиго(дТ):поли(рА) и относительная потеря активности с олиго(дТ):поли(дА) является доказательством активности, характерной для вирусного фермента. Большинство бактериальных и клеточных ДНК-полимераз предпочитают олиго(дТ):поли(дА), особенно в присутствии Mg<sup>2+</sup>.

Две матрицы-затравки могут быть относительно специфичны для вирусной обратной транскриптазы — олиго(дТ):поли(рА) и

олиго(дГ) : поли(рЦ). Возможность проведения реакции на этих матрицах и отсутствие реакции на олиго(дТ) : поли(дА) — основные отличия вирусной обратной транскриптазы от клеточных ДНК-полимераз.

Таким образом, несмотря на большое сходство механизмов реакции для вирусных, клеточных и бактериальных ДНК-полимераз, следует еще раз обратить внимание на большие отличия в относительной эффективности синтеза, направляемого этими ДНК-полимеразами на разных матрицах-затравках.

*Другие виды ферментативной активности  
в вирусных частицах*

Вскоре после обнаружения в онкорнавирусах РНК-зависимой ДНК-полимеразы, в ассоциации с вирусными частицами были найдены другие ферментативные активности. Это рибонуклеаза Н (Mölling et al., 1971), дезоксирибонуклеазы (Mizutani et al., 1970; Mölling et al., 1971; Hurwitz, Leis, 1972b; Hung, 1973), полинуклеотидлигаза (Mizutani et al., 1971), протеинкиназа (Strand, August, 1971), нуклеотидкиназа (Mizutani, Temin, 1971), фосфатаза (Mizutani, Temin, 1971), гексокиназа, лактатдегидрогеназа (Mizutani, Temin, 1971), тРНК-нуклеотидилтрансфераза (Fargas et al., 1974). Некоторые из этих активностей были связаны с ядром вируса, остальные представляли собой клеточную контаминацию. Только РНК-зависимая ДНК-полимераза, лигаза и рибонуклеаза (РНК-аза Н) были обнаружены внутри вирионов в ассоциации с нуклеоидом.

**Рибонуклеаза Н.** Особый интерес представляет собой РНК-аза Н, фермент, впервые обнаруженный Стейн и Хаузенем (Stein, Hausen, 1969; Hausen, Stein, 1970) в тимусе телят и обладающий интересной субстратной специфичностью — способностью гидролизовать рибонуклеотидную цепь в составе гибрида ДНК:РНК. Впервые РНК-аза Н была описана в AMV Мёллинг и др. (Mölling et al., 1971). Они обнаружили, что эта активность не отделяется от ДНК-полимеразной активности в процессе очистки, не деградирует ДНК-нить в составе гибрида ДНК:РНК, однонитевую или двунитевую ДНК или однонитевую РНК. Основываясь на этих данных, авторы предполагают, что РНК-аза Н играет важную роль в процессе освобождения свободной ДНК из гибридов ДНК:РНК в полимеразной реакции.

Эти данные нашли подтверждение в нескольких лабораториях (Baltimore, Smoler, 1972; Grandgenett et al., 1972, 1973; Keller, Crouch, 1972; Leis et al., 1973; Watson et al., 1973).

РНК-аза Н и РНК-зависимая ДНК-полимераза AMV ассоциированы с  $\alpha$ -субъединицей (Grandgenett et al., 1973). РНК-аза Н деградирует меченые рибополимеры в присутствии комплементар-

ных дезоксирибополимеров, кроме  $^3\text{H}$ -полиУ:поли (дА) (Leis et al., 1973). Балтимор и Смоллер (Baltimore, Smoler, 1972) описали механизм действия РНК-азы Н как эндонуклеазный, однако более детальные эксперименты показали, что РНК-аза Н представляет собой продвигающуюся экзонуклеазу, способную осуществлять деградацию РНК как в направлении от 5'-конца к 3'-концу, так и от 3'-конца к 5'-концу.

При сравнении свойств РНК-азы Н AMV и РНК-азы Н *E. coli* обнаружено, что бактериальный фермент представляет собой эндонуклеазу, продуцирующую олигонуклеотиды с 5'-фосфатным и 3'-гидроксильным концами (Leis et al., 1972). Продуктом деградации вирусной РНК-азы Н являются в основном динуклеотиды, в то время как тетра- и пентануклеотиды являются основным продуктом клеточной РНК-азы Н (Keller, Crouch, 1972).

О биологической функции РНК-азы Н было сделано несколько предположений. Меллинг и др. (Molling et al., 1971) предположили, что РНК-аза Н деградирует РНК в составе гибрида РНК:ДНК, а однонитевая ДНК затем используется для синтеза двунитевой ДНК. Существует и другая модель, объясняющая роль РНК-азы Н в транскрипции вирусной РНК в ДНК (Leis et al., 1973). Согласно этой модели, фермент действует на гибриды ДНК:РНК, освобождая короткие фрагменты однонитевой ДНК на 5'-и 3'-концах. Образующаяся молекула, по-прежнему состоящая из гибрида ДНК:РНК с фрагментами однонитевой ДНК, интегрируется в хромосому хозяина, где РНК-аза Н ядра (эндонуклеаза) деградирует внутренние последовательности РНК в гибриде ДНК:РНК с последующей репарацией ДНК и формированием дуплекса ДНК. Поскольку размер ДНК продукта на матрице 70S РНК не превышает 4–6S, то эта модель элиминирует необходимость интеграции многих мелких фрагментов ДНК в хромосому хозяина.

РНК-аза Н обнаружена, кроме AMV, в других вирусах — саркомы Рауса (Grandgenett et al., 1972), лейкозно-саркоматозного комплекса мышей — штамм Молони и Харви (Sarin et al., 1973), лейкоза мышей Раушера, лейкозно-саркоматозного комплекса кошек, вируса лейкоза кошек, вируса RD-114, вируса Мэзон-Пфайцера (Grandgenett et al., 1972), вируса саркомы перистистых обезьян, вируса саркомы кошек (Sarin et al., 1973).

Следует подчеркнуть, что о вирусах млекопитающих пока еще нет твердых данных, что эти активности не являются контаминацией со стороны клеток хозяина.

Полученные в последнее время данные свидетельствуют о том, что в вирусах млекопитающих уровень активности РНК-азы Н значительно ниже, чем у вирусов птиц. Кроме того, остается неясным вопрос о взаимоотношениях РНК-азы Н и обратной транскриптазы. С одной стороны, имеются данные, что РНК-азу



Н удается отделить от полимеразы в процессе очистки (Wang, Duesberg, 1974; Wu et al., 1974), а с другой — Мёлинг не удалось разделить оба типа активности при анализе ферментативной активности вируса лейкоза Френд (Mölling, 1974). Эти противоречивые данные говорят о том, что к вопросу о возможной роли РНК-азы Н в процессах интеграции следует подходить с большой осторожностью.

**Стимулирующий белок.** При исследовании транскрипции РНК с помощью обратной транскриптазы *in vitro* было обнаружено, что в процессе очистки активность транскриптазы уменьшается в 10—20 раз (Leis, Hurwitz, 1972a).

Лайс и Хервиц (Leis, Hurwitz, 1972a) выделили термочувствительный, недиализуемый фактор, восстанавливающий уровень транскрипции РНК. Он отделялся от обратной транскриптазы AMV при хроматографии на фосфоцеллюлозе. Фактор, названный авторами стимулирующим белком, оказался способным ингибировать реакции, катализируемые РНК фагов Q $\beta$  и I $_2$ . Кроме того, что стимулирующий белок восстанавливает уровень транскрипции РНК, он обладает еще одним свойством — вытесняет ДНК из гибрида ДНК:РНК. Это белок, по-видимому, является специфическим для полимеразы AMV (Leis, Hurwitz, 1972a).

#### *Вирусы, дефектные по обратной транскриптазе*

Обратная транскриптаза обнаружена в большинстве известных онкорнавирусов. Однако имеются исключения.

Некоторые типы клеток кур, зараженные дефектным RSV (штамм Брайен), продуцируют неинфекционные вирусные частицы RSV $_{\alpha}$ (0) (Hanafusa, Hanafusa, 1968). Показано, что частицы вируса RSV $_{\alpha}$ (0) дефицитны по РНК-зависимой ДНК-полимеразе (Hanafusa, Hanafusa, 1971). Природа этого дефекта остается неясной. С одной стороны, Робинсон и Робинсон (Robinson, Robinson, 1971) показали, что ферментативная активность вирионов при введении в систему экзогенной ДНК-матрицы катализирует синтез ДНК-продукта, но фермент не активен при введении РНК-матрицы. На основании этих данных авторы предположили, что частица вируса RSV $_{\alpha}$ (0) содержит дефектную РНК-зависимую ДНК-полимеразу.

Но другая группа авторов (Hanafusa et al., 1972a), используя моноспецифическую антисыворотку к вирусной обратной транскриптазе, показала, что частицы вируса RSV $_{\alpha}$ (0) вообще не содержат полимеразного белка. Кроме того, было обнаружено, что в клетках кур, продуцирующих RSV $_{\alpha}$ (0), активность этого фермента также не проявляется, т. е. можно предполагать, что

RSV<sub>α</sub>(0) не содержит гена обратной транскриптазы (Weissbach et al., 1972).

Описано также два вируса мышей, дефектных по ДНК-полимеразе; оба эти вируса неинфекционны (Gazdar et al., 1972; Bassin et al., 1971; May et al., 1972). Они содержат 70S РНК и имеют очень низкий уровень обратнотранскриптазной реакции.

Кроме того, описаны два типа латентных вирусов хомячков, дефектных по обратнотранскриптазной активности (Irlin et al., 1973; Somers et al., 1973).

Таким образом, обобщая вышеизложенные данные о свойствах обратных транскриптаз, следует считать, по предложению Сарина и Галло (Sarin, Gallo, 1973), что истинная обратная транскриптаза, как фермент, должна обладать следующими свойствами: 1) фермент должен присутствовать во фракции частиц и катализировать эндогенный синтез ДНК, чувствительный к РНК-азе в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и двухвалентных катионов; 2) продукт эндогенного синтеза должен быть хотя бы частично представлен в форме гибрида ДНК:РНК. ДНК-продукт должен гибридизироваться с матричной РНК, это свидетельствует о том, что синтез направляется РНК; 3) фермент должен растворяться детергентом и в КСl высокой концентрации; 4) фермент должен отдавать предпочтение олиго(дТ):поли(рА), перед олиго(дТ):поли(дА); 5) фермент должен обладать способностью к использованию олиго(дГ):поли(рЦ) в качестве матрицы-затравки; 6) фермент должен транскрибировать гетерополимерные последовательности вирусной 70S РНК; 7) данная полимеразы должна обладать определенными иммунологическими свойствами.

Соблюдение всех этих критериев при оценке выделяемой из клеток полимеразной активности весьма важно, прежде всего для дискриминации полимеразных активностей, поскольку некоторые ДНК-ДНК-зависимые полимеразы обладают характеристиками, типичными для обратных транскриптаз.

Исходя из этого, мы рассмотрим те системы, в которых к настоящему времени обнаружена обратная транскриптаза. Вопрос этот имеет принципиальное значение, поскольку обратная транскриптаза может служить маркером для выявления вирусного генома.

#### *Полимеразы нормальных клеток*

Коффин и Темин (Coffin, Temin, 1971a) описали РНК-азо-чувствительную эндогенную ДНК-полимеразную активность в незараженных фибробластах крыс. Продуктом реакции являлась ДНК. Аналогичная активность была обнаружена также в развивающихся эмбрионах кур как *gs*-положительных, так и *gs*-отрица-

тельных (Kang, Temin, 1973). ДНК-продукт этой реакции не гибридизировался с РНК вирусов саркомы Рауса или ретикулоэндотелиоза. Антитела против обратной транскриптазы вируса миелобластома не реагировали с выделенным ферментом. Но выделенный фермент с большей эффективностью (70 : 1) считывал матрицу (дТ<sub>10</sub>) : поли (дА), а не (дТ<sub>10</sub>) : поли (рА), как это имеет место для обратной транскриптазы.

РНК-азо-чувствительная эндогенная ДНК-полимераза во фракции лимфоцитов человека, стимулированных фитогемагглютинином, описана Бобровым и др. (Bobrov et al., 1972). Однако среди продуктов реакции не обнаружены гибриды ДНК : РНК. Кроме того, этот фермент не «работал» на матрице 70S вирусной РНК и отдавал предпочтение олиго(дТ) : поли(дА). Эти данные авторы интерпретируют таким образом, что, по-видимому, им удалось обнаружить ДНК-полимеразную активность, в которой РНК выполняет функцию затравки.

Описано также существование ферментов типа обратной транскриптазы в развивающихся ооцитах морского ежа (Crippa, Tochini-Valentini, 1971) и *E. coli* (Cavaliere, Carrol, 1971), однако детальное изучение этих ферментов показало, что они не отвечают тем критериям для обратной транскриптазы, которые представлены выше.

#### *Обратная транскриптаза в опухолевых клетках человека*

РНК-азо-чувствительная эндогенная ДНК-полимеразная активность была обнаружена Аккерманом и др. (Ackerman et al., 1971) в перевиваемой клеточной линии, полученной от больного с гранулоцитарной лейкемией. Галло и др. (Sarngadharan et al., 1972; Todaro, Gallo, 1973) из лейкоцитов больных острым лейкозом выделили частицы с плотностью 1,16 г/мл и обладающие обратной транскриптазной активностью. Синтез в этом случае носил эндогенный характер в присутствии четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и Mg<sup>2+</sup>. Часть продуктов реакции выявлялась в форме гибридов ДНК : РНК. Антисыворотка к обратной транскриптазе вируса С-типа гиббонов подавляла эту полимеразную активность.

Есть и другие данные о полимеразной активности в лейкоцитах человека. Наиболее достоверные результаты получены Тодаро и Галло, которые выделили фермент из лейкоцитов больных острым лейкозом, имеющий все свойства, характерные для обратных транскриптаз онкорнавирусов (Todaro, Gallo, 1973).

*Обратная транскриптаза в клетках,  
инфицированных онкорнавирусами*

Коффин и Темин (Coffin, Temin, 1971b) обнаружили эндогенную РНК-зависимую ДНК-полимеразную активность во фракции частиц («particulate fraction») в клетках кур, зараженных вирусом саркомы Рауса. Эта активность оказалась нечувствительной к обработке РНК-азой. ДНК-продукт гибридизировался с РНК из частиц и с РНК из вируса саркомы Рауса. Анализ фракции частиц в градиенте плотности сахарозы обнаружил две зоны полимеразной активности с плотностями 1,24 и 1,30 г/мл. В зоне с плотностью 1,15 г/мл обнаружена ДНК-полимеразная активность, стимулируемая ДНК, но не РНК. Авторы предположили, что частицы с плотностями 1,24 и 1,30 г/мл — предшественники зрелых вирионов.

Те же авторы анализировали клетки крыс, зараженные вирусом В77 (Coffin, Temin, 1972). Эти клетки трансформируются вирусом, но в них отсутствует продукция вирусных частиц. В этих клетках обнаружена эндогенная полимеразная активность, ассоциированная с частицами, имеющими плотность 1,14 г/мл; эти частицы и соответственно обнаруженная в них обратнотранскриптазная активность отличались от ферментов вирусов В77, MSV и эндогенного вируса крыс.

Кроме данных об ассоциации фермента с крупными частицами в зараженных клетках, имеются сообщения о выделении РНК-зависимой ДНК-полимеразной активности из клеток, минуя стадию выделения частиц с последующей очисткой фермента (Scolnick et al., 1974; Gerwin, Bassin, 1973). Показано также (Ross et al., 1972), что фермент из зараженных онкорнавирусами клеток мышей можно разделить на три основные фракции, две из которых принадлежат ДНК-полимеразам клетки, а одна представляет собой, по-видимому, вирусный фермент, который подавлялся антисывороткой к обратной транскриптазе вирусов С-типа мышей. Активность фермента из незараженных клеток этой антисывороткой не подавлялась. Дальнейшие доказательства различия ДНК-полимераз нормальных и зараженных клеток получены Гервин и Бассин (Gerwin, Bassin, 1973), которые показали, что фермент из зараженных клеток связывается с олиго (dT)-целлюлозой, а фермент из нормальных клеток не связывается. Аналогичные результаты были получены Ховик и др. (Howik et al., 1973). Следовательно, незараженные клетки не содержат действительную РНК-направляемую ДНК-полимеразную активность. В некоторых случаях она выявляется в незараженных эмбриональных клетках, но эта активность не родственна вирусной и, возможно, связана с протовирусами, согласно теории Темина (Temin, 1971). Что же касается истинной обратной транс-



криптазы, то можно считать твердо доказанным ее существование в вирусных частицах, в клетках, зараженных онкорнавирусами, в некоторых трансформированных клетках, в которых существование вируса не показано, и в некоторых эмбриональных тканях на определенных специфических стадиях развития.

\* \* \*

Совокупность приведенных выше данных позволяет представить следующий путь репродукции РНК-содержащих вирусов.

После проникновения вируса в клетку начинает работать обратная транскриптаза и происходит синтез полной копии вирусного генома. При этом образуется двуниевая ДНК с молекулярным весом около  $6 \cdot 10^6$  дальтон (Ali, Baluda, 1974). Очевидно, что в процессе синтеза ДНК первостепенная роль принадлежит обоим ферментам обратотранскриптазного комплекса — РНК-зависимой и ДНК-зависимой ДНК-полимеразам. Какова функция РНК-азы Н в этом процессе, остается неясным, но можно думать, что она играет определенную роль в элиминации РНК-матрицы после синтеза гибрида РНК:ДНК, что необходимо для последующего синтеза двуниевой ДНК. Происходит ли синтез на всех субъединицах РНК, также неизвестно, впрочем, как неизвестна и судьба родительских РНК. Можно предполагать, что синтезируемая ДНК затем инкорпорируется в геном клетки хозяина, хотя детали этой инкорпорации неизвестны. Неясной остается также роль других ферментов, обнаруженных в составе онкорнавирусов.

По-видимому, синтезируемый ДНК-продукт может интегрироваться в несколько мест в клеточном геноме, и механизм этой интеграции в принципе мало чем отличается от того, который имеет место в случае ДНК-содержащих вирусов. Дальнейшая экспрессия вирусной генетической информации, по-видимому, осуществляется с помощью клеточных ферментов, и в принципе здесь вряд ли могут быть обнаружены какие-либо отличия от ДНК-содержащих онкогенных вирусов.

Таким образом, основная функция обратной транскриптазы вирионов сводится к созданию вирусспецифической ДНК (провируса).

Существование такого провируса необходимо для проявления всех функций вирусного генома. Отсутствие в этом геноме определенных генов приводит к дискретной утрате функций, осуществляемых этим геномом (отсутствие трансформации, образование дефектных вирионов, неспособность к репликации и т. д.).

В последнее время на основании данных о подавлении трансформирующей активности онкорнавирусов с помощью ингибиторов обратной транскриптазы было высказано предположение, что

обратной транскриптазе принадлежит значительная роль и в самом процессе трансформации. Однако такое суждение, на наш взгляд, не достаточно обоснованно, поскольку многие вирусы, не вызывающие трансформацию (лейкозные вирусы, td-мутанты саркоматозных вирусов птиц), тем не менее содержат активную обратную транскриптазу. Все дело, по-видимому, в том, имеет или не имеет вирус в своем составе ген трансформации — существование этого гена при активной обратной транскриптазе обеспечивает вирусу возможность трансформировать клетку, его отсутствие при активном ферменте лишает вирус этой возможности. Что же касается ингибиторов полимеразы, то их «анти-трансформирующий» эффект скорее всего обусловлен действием только на фермент, и, как следствие этого, отсутствует интеграция генома вируса в геном клетки хозяина. Такой неинтегрированный геном не способен к самостоятельной репликации и к продукции белков, необходимых для перевода клетки в трансформированное состояние.

Заканчивая этот раздел, можно сделать следующие основные выводы: 1) обратная транскриптаза РНК-содержащих опухолевых вирусов отлична от обычных клеточных ДНК-полимераз; 2) она кодируется вирусным геномом; 3) ее присутствие ограничивается зараженными (но не обязательно вируспродуцирующими клетками), т. е. клетками, где имеется экспрессия (полная или частичная вирусного генома); 4) другие типы обратных транскриптаз могут присутствовать в некоторых (особенно эмбриональных) нормальных тканях, но их отношение к вирусному ферменту остается неясным; 5) фермент, по-видимому, необходим для инициации неопластической трансформации; 7) его активность не является необходимой для поддержания трансформации; 8) обратная транскриптаза выявляется в опухолевых клетках человека, что указывает на экспрессию активности вирусных генов.

#### ГЕНОМ ОНКОРНАВИРУСОВ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

В предыдущем разделе рассмотрены данные о тех особенностях структуры онкорнавирусов, которые обеспечивают интеграцию вирусного и клеточного геномов. Несмотря на то, что мы пока не располагаем какими-либо определенными сведениями о детальных процессах самой интеграции, мы имеем твердые доказательства конечной стадии этого процесса — существования вирусного генома в составе клеточной ДНК.

Три группы фактов послужили основой для этих доказательств. Первая — обнаружение группоспецифического антигена в «безвирусных» опухолях. В настоящее время имеется большое количество экспериментальных данных по этому вопросу, обоб-

ценных в ряде обзоров (см. Шевлягин, 1973; Svoboda, 1968; Tooze, 1973).

Вторая группа фактов, подробно рассмотренная в главе 5, свидетельствует о том, что из трансформированных клеток, не продуцирующих вируса, удается с помощью ряда воздействий активировать инфекционный вирус.

Третья группа связана с выделением инфекционной ДНК из клеток, трансформированных онкорнавирусами. Честь этого открытия принадлежит Хиллу и Хилловой (Hill, Hillova, 1972a, 1974) и Свободе и др. (Svoboda et al., 1972). Эти группы авторов независимо одна от другой выделили из клеток крыс, трансформированных вирусом саркомы Рауса (ХС), тотальный препарат ДНК, который при внесении в фибробласты кур вызывал в них продукцию вируса Рауса (трансфекция). Это говорит о том, что геном РНК-содержащего вируса Рауса действительно ассоциирован с ДНК клеток ХС.

Интересно, что основная масса ДНК в этих опытах имела мол. вес около  $8 \cdot 10^6$  дальтон, т. е. меньше полного размера вирусного генома. В последнее время эти данные были уточнены, и показано, что инфекционность выявляется только в ассоциации с клеточной ДНК, имеющей константу седиментации около 28S (т. е. молекулярный вес примерно  $10 \cdot 10^6$  дальтон).

В последующих опытах Хилл и Хиллова (Hill, Hillova, 1972b), Хложанек и Свобода (Hlozaneck, Svoboda, 1972) показали, что выделяемый после трансфекции вирус идентичен тому, который использовали для трансформации клеток ХС крыс. Фрагментация ДНК до размеров с мол. весом  $0,75 \cdot 10^6$  дальтон снимала эффект трансфекции, в то время как денатурация ДНК щелочью заметного влияния на этот процесс не оказывала.

Хиллова и др. (Hillova et al., 1974) показали, что вирусспецифическая ДНК, обуславливающая феномен трансфекции, ковалентно связана с хромосомальной клеточной ДНК.

Купер и Темин (Cooper, Temin, 1974) разработали чрезвычайно чувствительный метод детекции инфекционной ДНК, обладающий в 10—100 раз большей чувствительностью, чем метод, предложенный Свободой и др. (Svoboda et al., 1972). Авторам удалось показать, что минимальный молекулярный вес ДНК, необходимой для трансфекции, из клеток, зараженных RSV, составляет 6— $10 \cdot 10^6$  дальтон, в то время как из клеток, зараженных вирусом ретикулоэндотелиоза, 10— $20 \cdot 10^6$  дальтон. Не исключено, что разница в величинах инфекционной ДНК может отражать различные размеры полного генома вирусов, интегрированных в клеточную ДНК.

Принципиально сходные данные получили Лякур и др. (Lacour et al., 1972; Fourcade et al., 1974), которые выделили ДНК из лейкемических клеток крови кур, зараженных вирусом миело-

бластома птиц. В клетках кур, обработанных такой ДНК, наблюдалась продукция вирусных частиц без видимой морфологической трансформации культуры. Индуцируемые в этом случае вирусные частицы были лейкомагенными для кур. Как показали Огура и др. (Ogura et al., 1974), индуцируемый после трансфекции вирус представлял собой вирус, ассоциированный с вирусом миелобластома (MAV).

На модели онкорнавирусов млекопитающих подобного рода эксперименты проделали Карнас и Мильштейн (Karpas, Milstein, 1973). Они выделяли ядерную ДНК из клеток хомячков и мышей, трансформированных вирусом саркомы Молони и не продуцирующим инфекционный вирус. Эту ДНК вносили в нормальные клетки мышей 3Т3 и в клетки мышей 3Т3, зараженные вирусом лейкемии Раушера. В обоих случаях наблюдалась морфологическая трансформация, но только клетки 3Т3, зараженные лейкемическим вирусом, продуцировали инфекционные частицы. Обработка ДНК ДНК-азой полностью элиминировала указанные эффекты.

Обнаруженные и описанные феномены полностью подтвердили существование вирусного генома в геноме трансформированных клеток в ассоциации с ДНК. Но прямые данные о существовании вирусного генома в геноме зараженных онкорнавирусами клеток можно было получить только методом молекулярной гибридизации.

Наиболее простая модификация этого метода заключается в получении меченой 60—70S РНК и ее последующей гибридизации с ДНК из нормальных и зараженных клеток на нитроцеллюлозных фильтрах. Ранние работы, проведенные с помощью этого метода, дали результаты, трактовка которых оставалась неясной. Основная трудность заключалась в том, что полученные препараты вирусной РНК обладали сравнительно низкой удельной активностью, и имеющийся в любой реакции гибридизации неспецифический фон не позволял сделать каких-либо однозначных выводов, поскольку гибридизация наблюдалась не только с ДНК из опухолевых клеток, но и с ДНК, выделенной из нормальных клеток различных животных, в том числе и нечувствительных к данному вирусу, и даже с ДНК, выделяемой из водорослей и бактерий (см. Ирлин, Киселев, 1972).

Балуда и Дроган (Baluda, Drohan, 1972) на модели AMV разработали модификацию этого метода, заключающуюся в использовании клеточных систем, дающих высокие титры вируса на среде, содержащей четыре меченых радиоактивных предшественника РНК или  $^{32}\text{P}$ . Получаемая в этом случае РНК может использоваться для гибридизации как на нитроцеллюлозных фильтрах (Baluda, Markham, 1971), так и методом кинетики реассоциации (Britten, Kohne, 1968). О последнем методе уже говори-



лось в главе 6. Однако в данном случае используются меченая 60—70S вирионная РНК и значительный избыток клеточной ДНК (Melli et al., 1971). Наличие в такой ДНК последовательностей, комплементарных вирусной ДНК, приводит к образованию гибридов ДНК:РНК. Последующая обработка РНК-азой в средах высокой ионной силы приводит к элиминации меченой РНК, не связанной с ДНК, оставляя гибриды РНК:ДНК интактными и устойчивыми к действию РНК-азы.

Основное преимущество указанного метода заключается в том, что для гибридизации используется полная копия вирусного генома, и можно судить о распределении именно полной копии в клеточной ДНК.

Другой, еще более распространенный метод анализа вирус-специфических последовательностей в клеточной ДНК основан на использовании для гибридизации  $^3\text{H}$ -ДНК-продукта (см. раздел «Обратные транскриптазы»). Для этого в системе *in vitro* осуществляют синтез  $^3\text{H}$ -ДНК, используя вирус в качестве матрицы и источника обратной транскриптазы. Затем этот  $^3\text{H}$ -ДНК-продукт гибридизируют с ДНК клеток по методу кинетики реассоциации (Britten, Kohne, 1968). И в этом случае возможны две модификации данного метода. В первом случае используют двунитевой  $^3\text{H}$ -ДНК-продукт. Наличие в составе клеточной ДНК последовательностей, комплементарных вирусным, приводит к ускорению реассоциации двунитевого  $^3\text{H}$ -ДНК-продукта, отсутствие таких последовательностей не влияет на процесс реассоциации  $^3\text{H}$ -ДНК. Основной недостаток данного метода гибридизации заключается в том, что используемый двунитевой  $^3\text{H}$ -ДНК-продукт представляет собой копию лишь части вирусного генома, и, естественно, получаемые в этом случае величины уровней гибридизации не являются абсолютно достоверными. Другая модификация этого метода заключается в использовании однонитевого  $^3\text{H}$ -ДНК-продукта, синтез которого, как известно, происходит в присутствии актиномина Д (McDonnel et al., 1970). Наличие в клеточной ДНК последовательностей, комплементарных вирусной, переводит эту ДНК в двунитевую форму, что тестируется либо путем обработки нуклеазой  $S_1$ , специфичной для однонитевых ДНК, либо хроматографией на гидроксилпатите.

Эксперименты с использованием метода кинетики реассоциации были проведены с меченой ДНК, синтезированной в системе *in vitro* с использованием классических онкорнавирусов С-типа птиц и мышей, а также В-типа вируса рака молочных желез мышей. Двунитевая ДНК транскрибировалась в бесклеточной системе и при реассоциации в отсутствие гетерогенной ДНК обнаруживала, как правило, две фракции — быстрореассоциирующую и медленнореассоциирующую (Gelb et al., 1971b). Первая фракция была в основном представлена повторяющимися последова-

тельностью оснований, в то время как во второй фракции имеется уникальная последовательность оснований. Как правило, для опытов по реассоциации использовали медленно реассоциирующую фракцию, считывающуюся примерно с 30% вирусного генома.

В первых же экспериментах с использованием методов молекулярной гибридизации было показано, что как нормальные, так и зараженные клетки птиц и млекопитающих содержат нуклеотидные последовательности, специфичные для соответствующих вирусов (Rosenthal et al., 1971; Baluda, 1972; Varmus et al., 1972a, b; Fujinaga et al., 1973; Gelb et al., 1973).

В данной главе мы не будем рассматривать вопрос о вирус-специфических последовательностях в нормальных клетках, поскольку он будет детально рассмотрен в главе 8. Поэтому в данном разделе обсуждается вопрос о том, происходит ли дополнительная интеграция вирусного генома в ДНК чувствительных клеток природных хозяев при инфекции и вносится ли эта информация в вирогенные клетки млекопитающих, т. е. в клетки неприродного хозяина.

Несколькими группами авторов (Rosenthal et al., 1971; Varmus et al., 1972b; Gelb et al., 1973) в клетках мышей и кур (клетки природного хозяина) с использованием  $^3\text{H}$ -ДНК-продукта онкорнавируса было показано отсутствие дополнительной интеграции в зараженных клетках, что следует из данных таблицы, взятой нами из работы Балуды (Baluda, 1972).

В то же время при исследовании клеток млекопитающих, зараженных вирусом саркомы Рауса (клетки неприродного хозяина), в таких клетках выявлялось 4—6 копий вирусного генома, а в нормальных клетках млекопитающих геном вируса Рауса отсутствовал (Varmus et al., 1973b, c).

На другой системе с использованием ДНК, синтезированной на РНК вируса рака молочных желез мышей (MTV), были получены аналогичные данные. Использование вируса MTV имеет многие преимущества перед другими онкогенными РНК-содержащими вирусами, поскольку в настоящее время имеется широкий спектр линий мышей, обладающих различной степенью экспрессии этого вируса. Однако Вармус и др., анализируя кинетику реассоциации  $^3\text{H}$ -ДНК *in vitro* в присутствии ДНК из нормальных тканей мышей и из опухолей молочных желез низкораковых (C57BL) и высокораковых (GR) линий не обнаружили разницы в количестве интегрированных геномов ни в нормальных клетках мышей разных линий, ни в опухолевых тканях. Хотя в данной системе количество таких интегрированных геномов было необычайно высоким (98 на клетку), а уровень считывания ДНК с матрицы вирусной РНК не превышал 5%, тем не менее эти данные еще раз подтвердили, что в тех клетках, где геном

## ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕНОМА ВИРУСА РАУСА МЕТОДОМ КИНЕТИКИ РЕАССОЦИАЦИИ

Клетки	Продукция вируса Рауса	gs-Антиген вируса в РСК	Способность клеток к индукции вируса	Количество вирусных геномов на клетку
Фибробласты кур	—	—	+	10—15
То же	—	+	+	10—15
Фибробласты кур, трансформированные вирусом Рауса	+	+	—	10—15
Клетки перепелок	—	—	—	4—6
Нормальные клетки почки крыс	—	—	—	0
Те же клетки, трансформированные вирусом Рауса	—	+	+	2
Клетки мышей 3Т3	—	+	+	0
Те же клетки, трансформированные вирусом Рауса	—	+	+	2
Клетки хомячков (ВНК-21)	—	—	—	0
Те же клетки, трансформированные вирусом Рауса	—	+	—	1
HeLa, тимуса теленка	—	—	—	0

уже интегрирован, дополнительной интеграции при инфекции не происходит (Varmus et al., 1972a). Такие же данные были получены и с односторонним  $^3\text{H}$ -ДНК-продуктом, который представлял 60%-ную копию вирусного генома (Varmus et al., 1973a).

Однако, как указывалось выше, используемый метод гибридизации вирусного  $\text{H}^3$ -ДНК-продукта с клеточной ДНК не всегда дает адекватные результаты по двум причинам — из-за отсутствия полного переписывания РНК в  $\text{H}^3$ -ДНК-продукт и из-за сравнительно низкой чувствительности метода, поскольку возможная дополнительная интеграция в количестве 1—5 геномов вряд ли будет с достоверностью улавливаться этим методом. Особенно это относится к МГV, поскольку в этой системе использовался  $^3\text{H}$ -ДНК-продукт, составляющий лишь незначительную часть вирусного генома, и большое количество копий вирусного генома в нормальных клетках не позволяло уловить предполагаемую разницу после инфекции.

В том же случае, если использовали гибридизацию 60—70S  $^3\text{H}$ -РНК вируса с ДНК из нормальных и зараженных клеток, было показано, что в зараженных клетках природного хозяина действительно происходит дополнительная интеграция вирусной информации в геном клетки хозяина (Baluda, Markham, 1970). Так, Балуда и др. (Baluda et al., 1972) использовали в ка-

честве модели вирус миелобластома птиц, который вызывает у кур различные типы опухолей. При гибридизации 60—70S  $^{32}$ P-РНК этого вируса с ДНК из 24 нормальных и опухолевых клеток было обнаружено, что различные клетки содержат одно и то же количество вирусной генетической информации — в среднем 2—3 эквивалента генома на клетку. После инфекции количество вирусспецифической ДНК возрастает в опухолевых клетках в 2—3 раза, но это увеличение выявляется только в тех тканях, которые служат мишенью действия вируса.

В дальнейшем Балуда и др. несколько модифицировали собственную методику и использовали для гибридизации 35S субъединицы вирусной РНК и достаточно убедительно показали, что в чувствительных клетках кур, зараженных AMV, происходит дополнительная интеграция вирусного генетического материала (Shoyab et al., 1974). Такие же данные были получены и для ДНК селезенки мышей, зараженных RLV (Sweet et al., 1974).

Более подробно этот вопрос рассмотрен в работе Неймана (Neiman, 1972), основной вывод которой заключается в том, что при инфекции действительно имеет место дополнительная интеграция. Им было показано, что в саркомах кур, индуцированных вирусом Рауса, вирусспецифические ДНК состоят из двух основных фракций: а) быстро реагирующей с 60—70S вирусной РНК, соответствующей  $1/3$  вирусной информации и представленной, по-видимому, повторяющимися последовательностями нуклеотидов, и б) медленно реагирующей с 60—70S вирусной РНК (75% вирусной РНК и в основном уникальные последовательности). В то же время, когда использовалась ДНК из нормальных клеток, лишь 29% 60—70S РНК, т. е. в 2,5—3 раза меньше, чем в опухолевых клетках, ассоциировалось с уникальными последовательностями в ДНК. Подсчитано, что фракция медленно реагирующих последовательностей имеет низкую частоту встречаемости в саркомных клетках (1,5 на клетку), в то время как быстро реагирующие последовательности встречаются в количестве около 100 копий на клетку. Причины такой гетерогенности остаются неясными.

Аналогичные данные получил Нейман на двух других вирусах — RD-114 и RAV (Neiman, 1973a, b). В то же время в нормальных клетках обезьян, по данным Скольника и др. (Scolnik et al., 1974), отсутствует генетическая информация экзогенных онкорнавирусов обезьян (в этих опытах использовали 60—70S меченую РНК вируса гиббонов или шерстистых обезьян). При инфекции чувствительных клеток природного хозяина наблюдается интеграция вирусспецифической ДНК в геном клетки в количестве, по-видимому, всего лишь 1—2 копий.

Особое место занимает вопрос о существовании вирусспецифических последовательностей в клетках человека. Эксперименты по-



добного рода были в основном выполнены группой Спигельмана (Schlom et al., 1971, 1972; Axel et al., 1972a, b, c; Baxt et al., 1972; Gulati et al., 1972; Feldman et al., 1973).

Первоначально эти авторы выделили из лейкоэмических клеток человека частицы, обладающие биохимическими характеристиками известных онкорнавирусов и содержащие активную обратную транскриптазу. С помощью этих частиц *in vitro* осуществляли синтез  $^3\text{H}$ -ДНК, которую гибридизировали с высокомолекулярной РНК, выделенной из этих частиц, отделяли гибрид и элиминировали оттуда матричную РНК. Такая сложная процедура была необходима для получения высокоочищенной и специфичной  $^3\text{H}$ -ДНК. Использование этой  $^3\text{H}$ -ДНК в молекулярно-биологических тестах показало, что нуклеотидные последовательности, характерные для вирусоподобных частиц, присутствующих в лейкоэмических клетках, отсутствуют в нормальных клетках человека. Естественно, что такие последовательности выявлялись в ДНК лейкоэмических тканей человека. Особенно наглядно это было продемонстрировано при использовании клеток крови двух близнецов — больного лейкозом и здорового. В первом случае ДНК клеток содержала последовательности, гибридизирующиеся с  $^3\text{H}$ -ДНК-продуктом, во втором случае они отсутствовали.

При всем интересе, который представляют эти данные, они тем не менее оставляют широкий круг неясных вопросов. Два из них, по-видимому, основных: нет никаких доказательств того, что обнаруженные авторами частицы — этиологический фактор заболевания, и наблюдаемые авторами уровни гибридизации чрезвычайно низки и находятся на грани чувствительности метода.

Таким образом, из вышеизложенного следует, что в процессе инфекции онкорнавирусами происходит синтез провирусной ДНК. В последнее время получены данные о кинетике образования вирусспецифической ДНК (Ali, Baluda, 1974), из которых следует, что синтез вирусспецифической ДНК при инфекции клеток вирусом миелобластома при высокой множественности инфекции начинается уже через 1 час после заражения. У вируса саркомы этот синтез улавливается несколько позднее. Но в том и в другом случае синтез, который характеризует свободную вирусспецифическую ДНК, продолжается до 48 час., а затем уменьшается.

В то же время в интегрированной с геномом форме вирусспецифичная ДНК обнаруживается только после 24 час., и ее количество в ассоциации с клеточной ДНК возрастает до 72 час., а затем остается на прежнем уровне. Еще два факта, полученных в этой работе, представляют интерес. Во-первых, интегрированная ДНК обнаружена в форме полной копии 35S субъединицы (молекулярный вес  $3,0 \cdot 10^6$  дальтон), т. е. в отличие от системы *in vitro* обратная транскриптаза вирионов (правда, возможно, в сов-

местном действии с другими клеточными ферментами и прежде всего полинуклеотидлигазами) осуществляет полную и непрерывную транскрипцию вирусной РНК в инфицированной клетке. Во вторых, кинетика синтеза вирусспецифической ДНК и ее интеграция в фибробластах кур, т. е. в клетках природного хозяина, были сходны как для трансформирующего вируса саркомы Рауса, так и для нетрансформирующего вируса миелобластога птиц (Ali, Baluda, 1974).

В эмбриональных клетках мышей, зараженных RLV, вирусспецифическая ДНК обнаруживается в цитоплазме (т. е. в неинтегрированной форме) через 3 часа после инфекции. Эта ДНК разделяется на два компонента: один с молекулярным весом  $2,25-3,25 \cdot 10^6$  дальтон, и второй — размер которого несколько превышает размеры ДНК-продукта, синтезируемого *in vitro* (Lovinger et al., 1974).

На основании этих данных можно предполагать, что и в системе *in vivo* вначале происходит синтез коротких фрагментов ДНК, которые затем уже «сшиваются» в клетке соответствующими полинуклеотидлигазами. Процесс синтеза вирусспецифической ДНК происходит независимо от ядра, он может иметь место в безядерных клетках (Varmus et al., 1974).

По-видимому, после «сшивания» образуется циркулярная форма ДНК и уже в таком виде ДНК интегрируется в хромосому клетки (Guntaka et al., 1975).

О локализации вирусного генома в клеточной ДНК имеется весьма незначительная информация. Кроме некоторых данных, представленных Нейманом, дополнительные результаты получены группой Балуды (Evans et al., 1974). Оказалось, что в нормальных клетках эндогенная вирусная ДНК находится в ассоциации с умеренноповторяющимися последовательностями в клеточной ДНК и каждая интеграционная единица имеет максимальный молекулярный вес, эквивалентный 35S субъединице вириона. В зараженных клетках обнаруживаются дополнительные последовательности, которые интегрируются либо в участок ДНК, соседствующий с уникальными последовательностями, либо в участок, находящийся в тандеме с эндогенной вирусной ДНК.

На основании данных этого раздела можно сделать следующие выводы:

1. Нормальные клетки кур и мышей содержат в своем составе фрагмент ДНК, комплементарный вирусному геному.

2. Нормальные клетки приматов и, по-видимому, человека не содержат информации известных на сегодня экзогенных вирусов С-типа.

3. Инфекция онкорнавирусами клеток как природных, так и неприродных хозяев сопровождается интеграцией вирусспецифической ДНК в геном клетки. При этом у природного хозяина

происходит дополнительная интеграция информации экзогенного вируса.

4. Кинетика интеграции провирусной ДНК имеет одинаковый характер для трансформирующих и нетрансформирующих вирусов.

#### ЭКСПРЕССИЯ ВИРУСНОГО ГЕНОМА

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что геном онкорнавируса в форме провирусной ДНК находится в тесной ассоциации с ДНК, связанный с ней ковалентными связями (Markham, Baluda, 1974). Эти результаты являются прямым подтверждением вирусно-генетической теории и провирусной гипотезы Теммина.

Однако ясно, что для проявления действия вируса одного закрепления наследственной информации мало, необходимо, чтобы этот геном начал «работать», т. е. необходима экспрессия этой информации — синтез вирусспецифических РНК.

До недавнего времени обнаружение вирусспецифических РНК в клетках представляло известные методические трудности по ряду технических причин. Обнаружение обратных транскриптаз открыло широкие перспективы в этом направлении, поскольку в системе *in vitro* появилась реальная возможность синтеза высокоактивной ДНК, специфичной для вирусного генома, которую затем и подвергают гибридизации с РНК (ядерной или цитоплазматической) из зараженных и нормальных клеток.

Однако следует подчеркнуть, что, несмотря на качественно иной методический подход, в ряде случаев чувствительность этого метода выявления вирусспецифической РНК меньше, чем чувствительность метода выявления белков в радиоиммунологическом тесте. Этим, вероятно, и объясняются некоторая разница в результатах выявления вирусспецифической РНК в нормальных клетках мышей, где обнаружен группоспецифический антиген лейкозно-саркоматозного комплекса мышей, а также данные об отсутствии вирусной РНК в клетках, трансформированных вирусами кур (Coffin, Temin, 1972).

Первыми использовали метод гибридизации вирусного  $^3\text{H}$ -ДНК-продукта с клеточной РНК Грин и др. (Green et al., 1971), которые в клетках, зараженных вирусом саркомы Молони и продуцирующих этот вирус, обнаружили вирусспецифическую РНК MSV как в ядрах, так и в цитоплазме, где она составляла 5% и 0,5—1% ядерной и цитоплазматической РНК соответственно. В клетках мышей, трансформированных этим вирусом и его не продуцирующих, количество вирусной РНК было в 50—100 раз меньше. В нормальных клетках (при наличии в них провирусной ДНК) вирусной РНК обнаружить не удалось. Эти данные

послужили первым указанием на то, что в различных клетках имеет место различная экспрессия вирусной генетической информации. Такие же данные были получены и для клеток, зараженных вирусами кур (Rosenthal et al., 1971; Gararin et al., 1971 a, b).

В клетках, не продуцирующих вирус, но содержащих группоспецифический антиген онкорнавирусов, как правило, обнаруживается и вирусспецифическая РНК; в клетках, негативных по *gs*-антигену, вирусная РНК, как правило (по крайней мере с помощью указанного метода), не обнаруживается (Benveniste, Scolnick, 1973; Schincariol, Joklik, 1973).

Как показали Хайвард и Ханафуза (Hayward, Hanafusa, 1973), в клетках, зараженных RSV, имеется РНК, которая полностью комплексируется с  $^3\text{H}$ -ДНК-продуктом. Количество такой РНК составляет 0,7—0,9% тотальной РНК, что соответствует наличию 3000—4000 копий вирусного генома. В клетках же не продуцирующих вирус, но содержащих *gs*-антигены вирусов птиц лейкозно-саркоматозного комплекса, гибридизация составляла лишь 36—45%.

Как указывалось выше, геном саркоматозных вирусов имеет дополнительные нуклеотидные последовательности, отсутствующие в лейкозных вирусах. Было показано, что в клетках, зараженных саркоматозными вирусами, вирусспецифические РНК также содержат дополнительные последовательности, отсутствующие в РНК из клеток, зараженных лейкемическими вирусами (Benveniste et al., 1973; Benveniste, Scolnick, 1973; Tsuchida et al., 1974c, d).

При изучении синтеза вирусспецифической РНК MTV Вармус и др. (Varmus et al., 1973) показали, что 0,23% клеточной РНК является вирусспецифической. Авторам не удалось обнаружить принципиальных различий в уровнях экспрессии РНК в линиях мышей с высокой и низкой частотой опухолей. Не было обнаружено также корреляции между присутствием вирусного антигена и количеством вирусспецифической РНК. В разных типах клеток было обнаружено от 30 до 100 копий вирусного генома.

Естественно, что синтез вирусспецифической РНК начинается в ядре, где она синтезируется на матрице провирусной ДНК. Эта ядерная РНК гетерогенна (4—50S) (Leong et al., 1972), что, по-видимому, связано с тем, что РНК считывается с генома в ассоциации с клеточной РНК как это имеет место и для ДНК-содержащих вирусов (Parson et al., 1973).

Что касается цитоплазматической РНК, то результаты работ, проведенных на модели вирусов мышей, можно обобщить следующим образом. Клетки, зараженные саркоматозным вирусом MSV (MLV) или лейкозным вирусом (MLV), содержат два типа вируса специфической РНК с коэффициентами седиментации 35S



и 20S. В виrogenных клетках млекопитающих (в клетках неприродного хозяина), трансформированных, но не продуцирующих вируса, содержится только 33S РНК (Tsuchida et al., 1972, 1973, 1974a, b, c, d; Scolnick et al., 1973). Другой группой авторов (Gielkens et al., 1974) в цитоплазме чувствительных клеток, зараженных вирусом Раушера, кроме 35S и 20S РНК, выявлена также и 14S РНК. В опытах по конкурентной гибридизации показано, что 35S РНК из клеток полностью тождественна 35S субъединицам вирионной РНК, в то время как 33S РНК из виrogenных клеток млекопитающих лишь на 50% гибридизуется с  $^3\text{H}$ -ДНК-продуктом, т. е. 33S РНК содержит лишь часть последовательностей 70S вирионной РНК (притом, что в таких клетках имеется полный вирусный геном) (Vecchio et al., 1973; Tsuchida, Green, 1974).

Каковы взаимоотношения между 35S и 20S РНК, в настоящее время сказать трудно, но можно предполагать, что 20S РНК представляет собой самостоятельный вид РНК, а не является продуктом деградации 35S РНК или какой-то иной ее структурной формой. Однако то, что эта РНК присутствует только в клетках вируспродуцирующих, подразумевает, что она должна выполнять какие-то важные функции в процессе синтеза вирионов. Остается неясным также вопрос о том, с какой же части вирусного генома считывается 20S РНК, если показано, что 35S вирусная РНК и есть продукт полного вирусного генома.

Все виды РНК обнаружены и в полисомах зараженных клеток, т. е. очевидно, что эти РНК направляют синтез определенных вирусспецифических белков, хотя мы пока не знаем, каких именно (Axel et al., 1972c; Wang et al., 1973; Vecchio et al., 1973; Shanmugam et al., 1974).

35S РНК обнаруживается только в свободных полисомах, в то время как 35S и 20S РНК — в ассоциации с мембранно-связанными полисомами (Shanmugam et al., 1974).

Таким образом, в разных системах, зараженных онкорнавирусами, имеет место разный уровень экспрессии генетической информации. В вируспродуцирующих клетках происходит транскрипция всего генома, а в трансформированных клетках — от 30 до 50% генома. Эти РНК, по-видимому, необходимы клетке для поддержания статуса трансформации.

Несколько иной подход к решению вопроса об экспрессии генетической информации генома онкорнавирусов был использован в экспериментах группы Спигельмана (Axel et al., 1972a, b; Kufe et al., 1972; Nehlman et al., 1972).

Отправной точкой этих исследований послужило предположение о том, что в основе проявления онкогенного действия вирусов должны лежать какие-то общие закономерности, причем эти закономерности могут детерминироваться одними и теми же гена-

ми. Как следствие этого, в лейкозных и саркоматозных клетках должны существовать какие-то общие типы РНК.

Для проверки этого предположения на матрице лейкозного вируса мышей осуществляли синтез меченой ДНК, которую затем гибридизировали с полисомальной РНК из нормальных клеток, из лейкемических клеток мышей, других млекопитающих, нормальных и лейкемических клеток человека. Полученные гибриды тестировали методом центрифугирования в равновесном градиенте  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ . Оказалось, что часть полисомной РНК из лейкемических тканей любого происхождения способна гибридизоваться с 3—4%  $^3\text{H}$ -ДНК-продуктом лейкемического вируса. Гибридизация наблюдалась также в том случае, если использовали РНК из лейкозных тканей человека и животных, но никакой гибридизации не наблюдалось при использовании РНК из тканей молочной карциномы мышей и человека (Nehlman et al., 1972a). Аналогичные данные получены, когда для гибридизации использовали РНК из саркоматозных тканей мышей и человека (Kufe et al., 1972). Во всех клетках, где имелась инфекция лейкемическим вирусом С-типа, обнаруживалось некоторое количество высокомолекулярной полисомальной РНК, способной гибридизоваться с  $^3\text{H}$ -ДНК, синтезированной на вирусах С-типа лейкемических или саркоматозных, и не способной гибридизоваться с  $^3\text{H}$ -ДНК, синтезированной на вирусе В-типа.

В соответствии с этими данными находятся результаты экспериментов Бакста (Baxt, 1974), который показал, что в ДНК лейкемических клеток человека и в геноме РНК вируса Раушера имеются общие нуклеотидные последовательности.

$^3\text{H}$ -ДНК, специфичная для вируса В-типа мышей, с той же эффективностью (3—4%) гибридизовалась с РНК только раковых тканей молочной железы мышей и человека и не гибридизовалась с РНК из лейкемических тканей (Axel et al., 1972a).

Полученные данные свидетельствовали о том, что в лейкемических и саркоматозных тканях животных различных видов могут присутствовать РНК, имеющие весьма близкие нуклеотидные последовательности. В то же время экспрессия информации в раковых тканях молочной железы отлична от таковой при лейкозах и саркомах. В последнее время в опухолях молочных желез человека обнаружена РНК, способная гибридизоваться с  $^3\text{H}$ -ДНК-продуктом вируса Мэзон-Пфайцера (Colcher et al., 1974).

Интересно, что РНК, комплементарные  $^3\text{H}$ -ДНК вируса лейкоза мышей, обнаружены в лимфатических узлах людей с болезнью Ходжкина (лимфогрануломатоз) (Nehlman et al., 1972b) и в клетках лимфомы Беркитта (Kufe et al., 1973a). Последнее заблуждение, как известно, связывают с ДНК-содержащим вирусом группы герпеса, и обнаружение в клетках лимфомы РНК, специфичной для вирусов С-типа, а затем и частиц, содержащих обрат-

ную транскриптазу (Kufe et al., 1973b), поставило вопрос о роли совместной инфекции ДНК- и РНК-содержащего вируса в этиологии лимфомы Беркитта. Не исключено, что подобный факт имеет место и в случае вируса болезни Марека (Peters et al., 1973c).

Вероятно, здесь следует оговориться, что все эксперименты группы Спигельмана выполнены в основном с использованием метода центрифугирования продуктов гибридизации в градиенте  $Cs_2SO_4$ . В ряде случаев с помощью этого метода в гибридную зону попадают не истинные двунитевые комплексы РНК:ДНК, а ложные гибриды, образующие не полностью комплементарные нити. Однако использование нуклеазы  $S_1$ , специфичной для однонитевых полинуклеотидов, дало одинаковые результаты.

Группой Спигельмана в практику исследования был введен еще один метод выявления вирусспецифических продуктов (Schlom, Spiegelman, 1971a). Этот метод основан на том, что в онкорнавирусах обратная транскриптаза находится в ассоциации с 60—70S РНК и катализирует синтез коротких фрагментов ДНК, которые в течение первых 10—15 мин. реакции остаются в ассоциации с 60—70S. Если клетки содержат в своем составе какие-то компоненты онкорнавирусов, то естественно предполагать, что одним из проявлений экспрессии вирусного генома в клетке является образование комплекса РНК — обратная транскриптаза. Используя определенные фракции клетки, действительно удалось обнаружить в пострибосомальной надосадочной жидкости частицы, обладающие обратнотранскриптазной активностью и способностью осуществлять синтез ДНК. ДНК после экстракции из полимеразной смеси и центрифугирования в градиенте сахарозы обнаруживалась в зоне с константой седиментации 60—70S, что свидетельствовало об ассоциации  $^3H$ -ДНК-продукта с 60—70S РНК. Этот метод получил название метода одновременной детекции 60—70S РНК и обратной транскриптазы.

Данный метод, основанный на молекулярно-биологическом подходе, необычайно перспективен для исследования тех систем, где вирус еще не выделен, но существует ряд в основном косвенных доказательств в пользу его участия в том или ином неопластическом заболевании. Прежде всего это относится к раковым заболеваниям человека, поскольку появилась реальная возможность обнаружения в клетках человека если и не целого вируса, то отдельных его компонентов.

И действительно, в лейкоэмических и саркоматозных клетках человека методом одновременной детекции были обнаружены частицы, содержащие 60—70S РНК и обратную транскриптазу (Gulati et al., 1972; Baxt et al., 1972; Axel et al., 1972b).

Другой группе авторов (Todaro, Gallo, 1973) удалось установить, что активность транскриптазы в таких частицах блокируется антителами к обратной транскриптазе вируса С-типа приматов.

Методом одновременной детекции обнаружили частицы в раковых тканях молочной железы (Schlom et al., 1971a, 1972). Однако при детальном изучении оказалось, что указанные частицы выявляются и в тканях нормальной молочной железы, причем отсутствует корреляция между обнаружением частиц с помощью метода одновременной детекции и данными электронной микроскопии.

Шлом и др. (Schlom, 1973) предложили еще один метод обнаружения вирусной РНК в лейкозных тканях. Этот метод обладает очень высокой чувствительностью и позволяет выявлять  $10^7$ — $10^8$  частиц в 1 мл среды, т. е. чувствительность этого метода как минимум в 10 раз выше, чем других используемых методов. Метод основан на том, что тотальный препарат РНК из опухолевых тканей центрифугируют в градиенте сахарозы и отдельные фракции градиента подвергают гибридизации с меченой полиуридиловой кислотой. Эта  $^3\text{H}$ -полиУ образует комплекс с РНК, содержащей фрагмент полиА. Поскольку коэффициент седиментации вирусной РНК составляет 60—70S и эта РНК содержит полиА, то наличие гибридизации  $^3\text{H}$ -полиУ с материалом из этой зоны градиента сахарозы будет свидетельствовать о наличии вирусной РНК в тотальном препарате клеточной РНК.

Из вышеизложенных данных можно сделать основные выводы:

1. Геном онкорнавирусов представлен 2—4 субъединицами РНК с константой седиментации 35—37S (молекулярный вес примерно  $3,0 \cdot 10^6$  дальтон).

2. Субъединицы трансформирующих вирусов по сравнению с субъединицами лейкозных вирусов содержат дополнительный олигонуклеотидный фрагмент, который, возможно, и несет в себе ген трансформации. Субъединицы вирусов, дефектных по репликации или дефектных по трансформации, имеют делецию в своем геноме.

3. После заражения клетки вирусная обратная транскриптаза осуществляет синтез ДНК-копии всего вирусного генома, которая затем интегрируется в клеточную хромосомальную ДНК. Процесс этот одинаков для трансформирующих и для нетрансформирующих вирусов.

4. В клетках природного хозяина на этой провирусной ДНК осуществляется синтез двух типов вирусспецифической РНК, и, следовательно, происходит полное копирование всего интегрированного генома. В трансформированных клетках неприродного хозяина происходит транскрипция лишь 30—50% полного вирусного генома.

5. В опухолевых клетках человека методами молекулярной гибридизации показано наличие вирусспецифических продуктов.



## Глава восьмая ЭНДОГЕННЫЕ ВИРУСЫ И «НОРМАЛЬНАЯ» ИНТЕГРАЦИЯ

Как бы ни был велик объем экспериментальных или теоретических материалов, представленных во всех предыдущих главах, во многом они лишь конкретизировали и дополнили ту систему взглядов, которая изложена в книге «Вирусогенетическая теория происхождения опухолей» (Зильбер, 1968).

Безусловно, новые факты и представления значительно расширили и углубили наше понимание механизмов индуцированного вирусного канцерогенеза, но в общем они не выходят за рамки вирусогенетической концепции. Однако «вечно зелено древо жизни», и с 1968—1969 гг. постепенно, а затем все более и более интенсивно стали накапливаться данные о «природном» вирусном канцерогенезе, которые уже не укладываются в эту концепцию, шире ее, данные, которые требовали принципиально иной трактовки. В 1969—1971 гг. появились новые гипотезы механизма природного канцерогенеза, в которые вирусогенетическая теория вошла в качестве интегральной части, в качестве одного из исходных постулатов, в правильности которых уже никто не сомневается. Все произошло так, как и должно было произойти, — любая, даже самая оригинальная теория или самый поразительный факт — лишь ступень в бесконечном движении к познанию.

Эти новые данные можно обобщить следующим образом:

обнаружение при электронномикроскопическом изучении типичных частиц С-типа онкорнавирусов в перевиваемых культурах нормальных и опухолевых клеток самых разных видов животных; выделенные из таких культур вирусные частицы обладали всеми характерными признаками онкорнавирусов — присутствием 60—70S РНК, обратнотранскриптазной активности, наличием характерного видоспецифического группового антигена типа gs-1, плавающей плотностью 1,16 г/мл и т. д., однако такие вирусы были, как правило, апатогенны, а часто и неинфекционны;

обнаружение в тканях и органах нормальных животных, а также в перевиваемых культурах нормальных, непродуцирующих С-тип вирусных частиц клетках вирусспецифических антигенов онкорнавирусов, главным образом, gs-1 антигена;

обнаружение в ДНК нормальных клеток нуклеотидных после-

довательностей оснований, комплементарных геному онкогенных онкорнавирусов;

возможность индукции онкорнавирусов С-типа в нормальных «безвирусных» клетках многими физическими, химическими и биологическими агентами — отсюда и название этих вирусов — эндогенные (см. Weiss, 1973; Huebner, 1973).

Все эти данные положили начало новой главе общей биологии — эндогенные вирусы, главе, которая в настоящее время стала подлинно «горячей точкой» биологии — проблемой, в которой перекрещиваются интересы многих дисциплин — вирусологии, генетики, онкологии, иммунологии, биологии развития, дифференцировки.

#### ЭНДОГЕННЫЕ ВИРУСЫ КУР

Проблема эндогенных вирусов и наиболее принципиальные вопросы, связанные с ней, впервые возникли при изучении взаимодействия вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса птиц с клетками эмбриональной ткани чистых линий кур.

По-видимому, первыми работами, связанными с проблемой эндогенных вирусов кур и эндогенных вирусов вообще, следует считать работы Догерти и Дистефано (Dougherty, Di Stefano, 1966), Пейна и Чабба (Payne, Chubb, 1968). Эти авторы показали, что в эмбриональных клетках ряда чистых линий «безлейкозных» кур иммунологическими методами удается обнаружить gs-1 антиген ALV. Более того, такая экспрессия gs-1 антигена, как показано при скрещиваниях, была детерминирована аутосомальным доминантным геном. Тщательное исследование позволило исключить в этих опытах врожденную бессимптомную лейкозную инфекцию — все исследованные клетки были «безвирусными», т. е. полностью «свободными» от инфекционных или неинфекционных частиц типа С (Dougherty et al., 1967).

Последующий прогресс в этой проблеме связан с работами Фогта, Вейсса, супругов Ханафуза и их коллег. Изучая взаимодействие дефектного штамма RSV-B с эмбриональными клетками чистых линий кур, авторы показали, что в ряде случаев трансформированные клетки не являются непродуцирующими, как считалось ранее, а постоянно образуют полный инфекционный вирус Рауса, но псевдотип его отличен от вируса, использованного для заражения. Такой феномен имел место только в клетках определенных линий кур или даже определенных эмбрионов. В то же время существовали линии кур и отдельные эмбрионы, в которых процесс взаимодействия вируса Рауса с клеткой при трансформации протекал «нормально», и в итоге получались типичные не продуцирующие инфекционного вируса трансформированные клетки (см. Vogt, 1967; Weiss, 1967, 1969; Hanafusa, Hanafusa, 1968).

Вейсс (Weiss, 1969), по-видимому, первый обратил внимание на то, что необычная продуктивная трансформация клеток дефектным штаммом RSV происходила лишь в клетках, синтезирующих *gs*-антиген ALV. Позднее Ханафуза и др. (Hanafusa et al., 1970a, b) установили, что продуктивная инфекция дефектным штаммом RSV происходит только в тех клетках, которые содержат определенный фактор, названный авторами *chf* (*chick-cell associated helper factor*); этот фактор был интегрально связан с нормальной куриной клеткой некоторых типов эмбрионов (фенотип *chf*<sup>+</sup>), он был необходим именно для созревания дефектного вируса Рауса в инфицированных клетках и определял антигенность и спектр чувствительных клеток для дефектного штамма RSV. Иными словами, *chf* крайне напоминал лейкозный вирус-«помощник» типа RAV, но был неотделим от клетки. Впоследствии было показано, что *chf* связан с гликопротеидным антигеном на мембране нормальной куриной клетки и ассоциирован, правда, весьма сложно, с продукцией такой клеткой *gs*-антигена (см. Weiss, 1973).

Скрупулезные исследования, проведенные Ханафуза и др. (Hanafusa et al., 1970a, b, 1972a) с нормальными клетками фенотипа *chf*<sup>+</sup>, не смогли выявить в них продукции частиц С-типа. Впоследствии эти же авторы (Hanafusa et al., 1970c) показали, что при определенных условиях, например при инфекции *chf*<sup>+</sup>-клеток различными штаммами ALV, в них можно индуцировать продукцию нового вируса-«помощника», антигенно идентичного *chf*. Этот вирус обладал уже всеми свойствами онкорнавируса и был назван авторами RAV-60. Антигенно RAV-60 отличался от всех известных ранее вирусов четырех подгрупп (А, В, С, D) лейкозно-саркоматозного комплекса птиц.

Год спустя Фогт и Фрис (Vogt, Friis, 1971) выделили аналогичный вирус — они обозначали его RAV-0 при инфекции *gs*<sup>+</sup>-клеток низкими дозами вируса Рауса.

Впоследствии вирусы типа RAV-60 и RAV-0 были объединены в новую — пятую подгруппу вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса птиц — подгруппу E (см. Weiss, 1973).

Дальнейшее развитие это направление получило после того, как Вейс и Пейн (Weiss, Payne, 1971) показали, что вирусы типа RAV-0 и RAV-60 могут быть индуцированы в *chf*<sup>+</sup>-клетках X-лучами, УФ-лучами, химическими канцерогенами или мутагенами. Вейс и др. (Weiss et al., 1971) подтвердили результаты этой работы и значительно расширили ее. Они показали, что X-лучи, канцерогены, уретан, митомицин С, УФ действительно индуцируют RAV-0 в клонах нормальных эмбриональных *gs*<sup>+</sup>-, *chf*<sup>+</sup>-клетках кур. Однако успешная индукция вируса типа RAV-0 была получена и в *gs*<sup>-</sup>-клетках. При этом индукция вируса, по-видимому, носила многоступенчатый характер, в ряде случаев в *gs*<sup>-</sup>-клетках

удавалось индуцировать всеми этими факторами только продукцию *gs*-антигена.

Все изученные к настоящему времени «индуцированные» вирусы из нормальных клеток кур принадлежали к подгруппе E ALV, и основной антиген наружной мембраны их был идентичен *chf*-фактору. Характерно было и то, что все «индуцированные» вирусы очень плохо размножались или не размножались совсем в том типе клеток, из которого их удалось индуцировать (см. Weiss, 1973).

Сейчас фронт работ значительно расширен и углублен, однако именно перечисленные исследования заложили основной фундамент проблемы и выявили основные факты: присутствие в нормальной клетке вирусспецифических продуктов; возможность активации инфекционного вируса С-типа в нормальной «безвирусной» клетке химическими, физическими и биологическими агентами; передача вирусного генома от клетки к клетке при делении как менделевского фактора (опыты с клонами); непермиссивность клеток для активированного в них вируса и, как вывод из всех этих данных, — вертикальный внутригеномный путь передачи вируса от клетки к клетке (см. подробно Weiss, 1973).

Куры не единственный вид птиц, содержащий интегрированный геном вируса С-типа: фактор, аналогичный *chf*, присутствует и в клетках фазанов, в ряде случаев он может находиться в них и в свободной форме, обладающей всеми свойствами вируса-«помощника» (Hanafusa, Hanafusa, 1973). Разные виды фазанов, по-видимому, содержат разные типы эндогенных онкорнавирусов, отличные от всех известных подгрупп ALV (Fujita et al., 1974).

Последующий этап в изучении эндогенных вирусов птиц был связан и обусловлен главным образом молекулярно-биологическими методами исследования. В целой серии публикаций, продолжающейся и по сегодняшний день, было показано, что нуклеотидные последовательности в ядерной ДНК, комплементарные РНК С-типа вирусов группы лейкозов птиц, присутствуют в безвирусных клетках всех исследованных генетически чистых линий цыплят (Baluda, 1972; Neiman, 1972, 1973b; Hayward, Hanafusa, 1973; Rosenthal et al., 1971). Такая ДНК отсутствует в клетках млекопитающих, но ее удается обнаружить в клетках крыс, мышей и обезьян, трансформированных вирусом Рауса (Varmus et al., 1973c; Baluda, 1972; Shoyab et al., 1974a). Количество вирусспецифической ДНК в нормальных клетках кур составляет примерно 10 эквивалентов полного вирусного генома на клетку (Varmus et al., 1972b; Baluda, 1972; Neiman, 1973b) и не зависит от того, в каких «безвирусных» клетках — *gs*<sup>+</sup> или *gs*<sup>-</sup> — она выявляется. Комплементарная вирусу ДНК локализована в клеточном ядре и интегрирована в форме линейной двуспиральной молекулы, кова-



лентно связанной с клеточной ДНК. Количество вирусспецифической ДНК в клетках кур не меняется в зависимости от ткани, типа клеток или возраста подопытных животных.

Клетки фазанов содержат ДНК, составляющую всего 10% вирусного генома ALV на клетку, несмотря на наличие gs-антигена ALV; клетки японских перепелок содержат не более 4% вирусного генома ALV на клетку (Neiman, 1973b).

В нормальных куриных клетках ДНК, комплементарная ALV, ассоциирована с повторяющимися (около 1200 раз) последовательностями клеточной ДНК и каждая интегрированная провирусная единица приблизительно эквивалентна 35S субъединице вирионной РНК (Evans et al., 1974). При этом, вне зависимости от gs<sup>+</sup>- или gs<sup>-</sup>-фенотипа клетки, ДНК нормального эмбриона содержит 40—100 копий быстро и 2—6 копий медленно реассоциирующих последовательностей оснований ALV на клеточный геном. Абсолютное количество быстро реассоциирующих последовательностей составляет примерно  $\frac{1}{3}$  от количества медленных (Evans et al., 1974; Shoyab et al., 1974a, b, c).

Природа вирусспецифической ДНК нормальных клеток интенсивно изучается. Первоначально Нейман (Neiman, 1972, 1973) показал, что только часть генома RSV (около  $\frac{1}{3}$ ) комплементарна вирусспецифической клеточной ДНК, в то же время РНК вируса RAV-0 гибридизируется с клеточной ДНК по крайней мере на 70% и даже выше. Аналогичные данные получены и для нуклеиновой кислоты AMV: только 35—60% РНК AMV гибридизируется с ДНК нормальных клеток (Shoyab et al., 1974b, c). При инфекции или при трансформации куриных клеток AMV количество вирусспецифических последовательностей в них увеличивается в 2—6 раз. При этом вирусспецифические последовательности в инфицированных или лейкемических клетках количественно и качественно отличаются от вирусспецифических последовательностей, имеющих в клетке до инфекции, и идентичны ДНК вируса AMV (Shoyab et al., 1974a, b, c).

Нейман и др. (Neiman et al., 1974) показали, что только РНК RAV-0 практически полностью гибридизируется с ДНК нормальных куриных клеток. РНК всех изученных авторами штаммов «экзогенных» онкорнавирусов птиц, как саркомных, так и лейкозных, с одной стороны, имели дополнительные участки генома, не комплементарные клеточной ДНК или РНК RAV-0, а кроме того, в РНК всех «экзогенных» вирусов отмечалось отсутствие части генома, комплементарной ДНК клетки или РНК RAV-0.

Следовательно, как биологические опыты по индукции вирусов подгруппы E в безвирусных клетках, так и анализ вирусспецифических последовательностей оснований в ДНК безвирусных клеток однозначно показывают убиквитарность генома эндогенного вируса группы ALV в куриных клетках. Отсутствие продукции

вируса в таких клетках, неоднократно доказанное, обуславливает возможность только вертикального пути передачи вирусного генома.

Степень клеточного контроля интегрированного вирусного генома, интенсивность транскрипции и трансляции его в норме и при малигнизации клетки — вот те проблемы, которые возникли сразу же после того, как был установлен факт интеграции вирусной ДНК (и индукции вируса) в нормальной клетке.

Первоначально, изучение многих линий безлейкозных кур иммунологическими методами — главным образом в РСК — позволило выявить чистые линии кур, в клетках которых, в отсутствие какой-либо видимой инфекции ALV, постоянно идет синтез  $gs$ -антигена. В то же время были обнаружены линии, фенотип которых характеризовался  $gs^-$ -признаком (см. Weiss, 1973).

Выделение чистых белков  $gs$ -комплекса и получение к ним моноспецифических сывороток позволило применить для анализа радиоиммунологический метод, который примерно в 100—1000 раз более чувствителен РСК. Этим методом  $p-27$  был обнаружен во всех тканях и клеточных культурах безлейкозных цыплят разных линий в количестве 7—36 нг на 1 мг клеточного белка (в тканях эмбриона). У взрослых кур количество  $p-27$  на 1 мг клеточного белка было в 2—5 раз ниже за исключением ткани селезенки (примерно 50 нг). Для сравнения укажем, что количество  $p-27$  в вируспродуцирующих клетках было в 100—1000 раз больше и составляло около 1% клеточного белка (Vaeheri, Ruoslahti, 1973).

Чен и Ханафуза (Chen, Hanafusa, 1974), проанализировав наличие  $p-27$  в  $gs^-$ -клетках индивидуальных куриных эмбрионов радиоиммунологическим методом, обнаружили этот антиген практически во всех  $gs^-$  (по РСК) эмбрионах (примерно 5 нг на 1 мг клеточного белка).

Таким образом, разница между  $gs^+$  и  $gs^-$ -фенотипом (по РСК) куриных эмбрионов носит, по-видимому, только количественный характер и все они могут считаться как  $gs^+$  (или правильнее  $p-27^+$ ). Однако количество  $p-27$  в клетках разных линий кур весьма сильно варьирует (см. ниже).

Выше мы писали о  $chf$ -факторе, присутствующем в клетках ряда линий куриных эмбрионов и обладающем свойствами вируса-«помощника» для созревания дефектного вируса RSV. Ханафуза и др. (Hanafusa et al., 1973) идентифицировали  $chf$ -фактор как гликопротеидный антиген клеточной мембраны  $chf^+$ -клеток (см. подробно, Weiss, 1973).

Суммируя результаты своих исследований, Ханафуза и его сотрудники классифицировали все изученные нормальные куриные эмбрионы следующим образом (см. Hanafusa et al., 1974; Chen, Hanafusa, 1974):

Фенотип клетки	Титр <i>gs</i> -антигена (p-27) в РСК	<i>chf</i> , усл. ед. вируса-«помощника»
<i>gs</i> <sup>-</sup> , <i>chf</i> <sup>-</sup>	0	0
<i>gs</i> <sup>-</sup> , <i>chf</i> <sub>L</sub>	0	10—200
(L-Low — низкое содержание)		
<i>gs</i> <sup>+</sup> , <i>chf</i> <sub>H</sub>	8	1000—3000
(H-High — высокое содержание)		
<i>gs</i> <sub>L</sub> , <i>chf</i> <sub>E</sub>	0—2	10 000—30 000
(E — Extremely high — очень высокое содержание)		
<i>gs</i> <sup>+</sup> , <i>chf</i> <sub>E</sub>	8	10 000—30 000

Используя моноспецифические антисыворотки к другим индивидуальным белкам ALV, Ханафуза и др. (Hanafusa et al., 1974), Чен и др. (Chen et al., 1974) показали, что p-15 и p-19 также постоянно синтезируются в эмбриональных клетках практически всех «безлейкозных» линий кур, причем как *gs*<sup>+</sup>, так и *gs*<sup>-</sup> (по РСК). Однако в *gs*<sup>-</sup>-эмбрионах количество p-19 и p-15 было примерно в пять раз меньше, чем в *gs*<sup>+</sup>-клетках.

Примерно такая же разница была отмечена авторами и в количестве p-27 в *gs*<sup>+</sup>-типе клеток по сравнению с *gs*<sup>-</sup>- или *gs*<sub>L</sub>-типами куриных эмбрионов.

Соотношение трех основных вирусных белков: p-27, p-19 и p-15 во всех типах клеток составляло в среднем 2:1:3,5, т. е. примерно соответствовало соотношению их в вирионах. Это позволяет думать о координированном контроле генов, ответственных за синтез этих белков в клетке. В то же время, несмотря на незначительные количественные различия, в синтезе белков в *gs*<sup>+</sup>- и *gs*<sup>-</sup>-клетках отмечалась большая разница (примерно в 100 раз) в содержании *chf* в этих двух типах клеток. В *gs*<sup>-</sup>, *chf*<sup>-</sup>-клетках в отсутствие синтеза *chf* обнаружены значительные количества p-27, p-19 и p-15.

Хайвард и Ханафуза (Hayward, Hanafusa, 1973) показали, что в неинфицированных *gs*<sup>+</sup>, *chf*<sup>+</sup> куриных клетках обнаруживается от 3 до 40 копий вирусспецифической РНК на клетку (примерно 0,1—1% от вируспродуцирующей системы). Содержание РНК коррелировало с *chf*-активностью клетки.

В клетках *gs*<sup>+</sup>, *chf*<sub>E</sub> количество групповых белков (p-27, p-15 и p-19) составляло примерно 1/100 часть вируспродуцирующей клетки; количество вирусспецифической РНК, обнаруживаемой в таких клетках, было 14—20 копий. Гибридизация этой РНК с односпиральной вирусспецифической ДНК RAV-0 составляла менее 50%. Это дает основание предположить, что не все последовательности, характерные для вирусной РНК, присутствуют или считываются в нормальных клетках.

Многokратно отмечалась корреляция между содержанием *gs*-антигена и *chf* в куриных клетках. Это дало основание считать, что оба они регулируются в клетке одним и тем же генетическим контрольным механизмом (см. Weiss, 1973). Хапафуза и др. (Hanafusa et al., 1974) детально проанализировали этот вопрос и подтвердили корреляцию между содержанием *gs*-антигена и *chf*. Их данные позволяют считать, что два гена, ответственные за синтез двух разных продуктов, контролируются одним регуляторным геном (примерно в 98% эмбрионов). Однако в этом же исследовании были найдены эмбрионы, фенотип которых определяется как *gs*<sup>-</sup>, *chf*<sub>B</sub>. Интересно, что эмбрионы такого типа содержали больше вирусспецифической РНК, чем эмбрионы фенотипа *gs*<sup>-</sup>, *chf*<sub>H</sub> (Hayward, Hanafusa, 1973).

Несмотря на постоянный синтез *gs*-антигена уже в эмбрионе, полной иммунологической толерантности к нему не отмечено. Так, Армстронг (Armstrong, 1969) описал преципитирующие антитела к *gs*-антигену в сыворотках цыплят, природно или экспериментально инфицированных ALV. Это было затем подтверждено и другими последователями. Используя радиоиммунологический метод, Руослахти и др. (Ruoslahti et al., 1973) обнаружили антитела к р-27 в сыворотках цыплят с опухолями Рауса или природно инфицированных ALV. У безлейкозных линий цыплят антитела не обнаружены. При экспериментальной инфекции антитела к *gs*-антигену ALV проявились у 80% цыплят спустя несколько недель после инфекции.

Обнаружение вирусспецифической ДНК в клетках всех изученных линий кур, как *gs*<sup>+</sup>, так и *gs*<sup>-</sup>, как *chf*<sup>+</sup>, так и *chf*<sup>-</sup> возможность индукции *gs*-антигена или полного вируса в «безвирусных» клетках показывает, что генетический анализ возможен, по-видимому, только на уровне генов, контролирующих экспрессию того или иного гена, интегрированного эндогенного вируса или клеточных генов, ответственных за его проявление. Именно в этом плане надо трактовать сейчас и первые работы Пейна и Чабба (Payne, Chubb, 1968) о менделевском типе наследования генов, ответственных за экспрессию *gs*-антигена.

Генетический анализ экспрессии разных генов эндогенного вируса кур по существу еще только начал. Ген, ответственный за экспрессию *gs*-антигена (имеется в виду р-27, для других белков неизвестно) при скрещиваниях разных линий кур (*gs*<sup>+</sup> и *gs*<sup>-</sup> по РСК), был определен как аутосомальный ген, и аллель его — (GS), детерминирующий экспрессию, доминировал над аллелем (*gs*), обуславливающим отсутствие экспрессии *gs*-антигена. Ген GS не влияет на репликацию в клетках экзогенного вируса ALV подгрупп А, В, С и D. В инбредной линии, изученной Вейссом и Пейном (Weiss, Payne, 1971), GS-локус контролировал экспрессию как *gs*-антигена, так и *chf*. Однако в другой линии кур экс-



прессия *gs*-антигена и *chf* не всегда коррелировала (Weiss, 1973; см. также Hanafusa et al., 1974).

*GS*-локус может также контролировать распространение RAV-0, активированного в нормальных клетках. Так, Пейн и др. (Payne et al., 1971) показали, что чувствительность клеток кур к инфекции вирусами подгруппы E контролируется двумя независимыми аутосомными доминантными генами. Один из них — доминантный ген для чувствительности — типа *tva*, *tvb*, вероятно, детерминирует синтез рецептора для RAV-0 на поверхности клетки. Он обозначен как *tve* подобно другим генам, контролирующим чувствительность клеток к определенным подгруппам ALV (см. выше). Другой ген — *I*, доминантный для резистентности, контролирует действие гена *tve*. Ген *I* может блокировать чувствительность к инфекции даже у линии, обладающей геном *tve*. Имеются доказательства, что этот ген-ингибитор (*I*) связан с *GS*-локусом и доминантный аллель, блокирующий чувствительность, вероятно, идентичен *GS*-аллелю (см. Weiss, 1973). Иными словами, частичная экспрессия генома эндогенного вируса может предотвращать экзогенную инфекцию вирусами подгруппы E. Резистентность к суперинфекции может быть вызвана синтезом избытка мембранного антигена (*chf*), который и будет блокировать в такой клетке рецептор для вирусов подгруппы E.

В природных условиях *GS*-аллель может предотвращать распространение спонтанно активированного RAV-0 от клетки к клетке, от животного к животному. Возможно, этим и объясняется резистентность большинства линий цыплят к эндогенным вирусам типа RAV-0, в то время как близкие виды птиц (например, перепелки), не содержащие генома эндогенного RAV-0, чувствительны к ним.

Описана линия кур, характеризующаяся высокой спонтанной виремией RAV-0. Спонтанная виремия, вызванная вертикально передаваемым RAV-0, находится под генетическим контролем. Гены, определяющие клеточную резистентность, предотвращают виремию (см. Crittenden et al., 1974). Однако ген *I*, обуславливающая резистентность клетки к инфекции вирусом, не подавляет самой продукции вируса в инфицированной клетке в этой линии.

Генетический анализ линий кур, спонтанно продуцирующих RAV-0 в течение всей жизни и имеющих «высокую» виремию, показал наличие еще одного доминантного гена (*V*), обуславливающего продукцию RAV-0 и отделенного от генов, контролирующих резистентность клеток к вирусам подгруппы E (см. Crittenden et al., 1974). Виремия RAV-0 у таких кур, следовательно, контролируется тремя генами: один детерминирует активацию вируса (*V*), другой (*tve*) — образование рецептора, необходимого для инфекции клетки, и третий — ген-ингибитор, блокирует экспрессию

гена-рецептора. Ген-индуктор (V) и ген-ингибитор (I) могут быть генами вируса и быть аллельными с GS-локусом (см. Weiss, 1973).

Следовательно, сейчас возможно выделить две независимые генетические системы, контролирующие эндогенный вирусный геном. Во-первых, это аутомальный доминантный ген, описанный Пейном и Чаббом (Payne, Chubb, 1968), который контролирует экспрессию неинфекционной информации (например, gs-антиген, chf) эндогенного вируса. Другая система доминантных генов контролирует образование полного вируса типа RAV-0. Локализация этих генов пока не известна.

При анализе данных, относящихся к эндогенным вирусам кур, обращает на себя особое внимание то, что клеточная ДНК, комплементарная вирусной нуклеиновой кислоте, в высокой степени гомологична не вообще РНК или ДНК вирусов группы ALV, а только нуклеиновой кислоте вирусов подгруппы E. Комплементарность клеточной ДНК нуклеиновой кислоте других вирусов группы ALV соответствует только тому участку их генома, который комплементарен RAV-0. Этот принципиальный факт должен помочь нам понять, действительно ли эндогенные вирусы играют прямую (трансформирующую) роль в онкогенезе. Мы приводили в качестве примера линию кур, клетки которых *in vivo* постоянно продуцируют как у взрослых, так и у эмбрионов громадные количества RAV-0, что выражается, в частности, в «высокой» виремии. Однако опухолей или лейкозов у таких кур обнаружить не удалось (см. Crittenden et al., 1974).

Выше мы писали, что у птиц, и в частности у кур, имеется еще одна группа онкогенных РНК-содержащих вирусов типа С — вирусы группы ретикулоэндотелиоза. Хотя вирусы этой группы содержат 60—70S РНК, обратную транскриптазу и цикл их репликации опосредован ДНК-провирсом, биологические свойства вирусов группы ретикулоэндотелиоза (REV) значительно отличаются от эндогенных и экзогенных вирусов группы ALV: 1) вирионы REV и ALV антигенно отличны, 2) отсутствует генетическая или физиологическая комплементария между ALV и REV, 3) размножение REV сопровождается цитопатогенным эффектом, 4) обратная транскриптаза вирионов ALV и REV имеет серологические отличия, 5) отсутствует какая-либо степень гомологии последовательности оснований между РНК REV и ALV. В то же время Канг и Темин (Kang, Temin, 1974) показали, что около 10% нуклеотидных последовательностей РНК REV присутствуют в ДНК нормальных клеток кур, фазанов, перепелок и индюшек (род Galliformes), но не в клетках уток (род Anseriformes). Более того, активность обратной транскриптазы REV ингибировалась антителами против очищенного фермента нормальных куриных клеток. Антигенная общность была обнаружена и между обратными транскриптазами ALV и REV (Mizutani, Temin, 1974).

Значение приведенных фактов не вполне ясно, но, возможно, они отражают эволюционные связи этих групп вирусов между собой и с клеткой-хозяина. При этом не исключено, что экзогенные вирусы типа REV произошли от какого-то эндогенного вируса, часть генетической информации которого сохранилась в клетках рода Galliformes.

То, что описанные эндогенные вирусы кур не лабораторный артефакт, а действительно существующие в природе агенты, показывают полевые исследования Вейсса (Weiss, 1973). Вейсс установил, что дикие красные куры также имеют в своем геноме вертикально передаваемый геном ALV подгруппы E. Эмбриональные клетки таких кур содержат gs-антиген и chf и резистентны к инфекции ALV вирусами подгруппы E (наличие гена I?). Более того, обработка таких клеток мутагеном ведет к индукции вируса типа RAV-0.

Последний вопрос, который мы хотели бы затронуть в этом разделе, — терминологический. Гросс (см. Gross, 1970, 1974) определил два способа передачи онкогенной инфекции — горизонтальный — от инфицированного животного неинфицированному при контакте или на расстоянии и вертикальный — от родителей потомству, одна из разновидностей которого — врожденная инфекция. При такой вертикальной инфекции вирус передается инфекционными вирусными частицами от родителей через молоко, плаценту, сперму, родовые пути зародышу или новорожденному. Вирус проникает в клетку реципиента через поверхностные рецепторы. Очевидно, что все или большинство факторов, контролирующих горизонтальную инфекцию, оказывают влияние на передачу и распространение такой вертикальной инфекции.

У эндогенных вирусов, где нет продукции вирусных частиц и где клетка хозяина является непермиссивной системой для вируса, оба эти пути передачи инфекции невозможны. Вирус в этом случае передается вертикально, в форме ДНК-провируса, интегрированного в геном, от родителей потомству как часть генетического фонда герминальных клеток. Если при врожденной инфекции вирус, как правило, передается от матери потомству, то в случае эндогенных вирусов оба родителя в равной степени могут передавать инфекцию. Факторы, контролирующие распространение инфекции на уровне клеток или организма, не играют роли при передаче ДНК-провируса. По-видимому, наиболее удачный термин для такого типа передачи инфекции — генетическая передача (см. Weiss, 1973). Однако в литературе очень часто такой способ передачи вирусного генома продолжают называть вертикальным. Этот тип наследственной передачи вирусной информации — генетический, внутригеномный, вертикальный и т. д. является существенным признаком эндогенного вируса. Однако этот признак вытекает из основного определения эндогенного вируса —

эндогенным вирусом мы называем вирус, полная генетическая информация которого в форме интегрированного ДНК-провируса содержится в геноме нормальной герминальной клетки.

#### РАЗЛИЧНЫЕ ТИПЫ ЭНДОГЕННЫХ ВИРУСОВ МЫШЕЙ

##### *Вирусы С-типа*

Наряду с опытами на курах, которые привели к открытию и выделению эндогенных вирусов птиц, проводились исследования вирусов мышей, итогом которых было открытие, выделение и широкое изучение эндогенных вирусов мышей. Первыми работами в этой области, так же как и для вирусов птиц, явились иммунологические исследования, из которых следовало, что gs-1 MuLV синтезируется в селезенке и тимусе практически всех мышей различных низколеukoзных линий (Иевлева и др., 1969; Abelev, Elgort, 1970; Huebner et al., 1970). Эти факты, обнаруженные одновременно советскими и американскими учеными, дали первые указания на возможность широкого, убиквитарного распространения лейкозных или близких им вирусов у мышей, что одновременно подтвердилось и вирусологическими исследованиями в лаборатории Roy (см. Hartley et al., 1969).

Существенным вкладом в изучение эндогенных вирусов мышей послужили работы Ааронсона и др. (Aaronson et al., 1969), показавших спонтанную активацию С-типа вируса в длительно пассируемой культуре нормальных клеток мышей, и Лави и др. (Lowy et al., 1971), которые индуцировали IudR и BudR продукцию С-типа онкорнавирусов в безвирусных нормальных эмбриональных клетках мышей АКР. Эти исследования, а также электронномикроскопическое обнаружение частиц С-типа в различных нормальных и опухолевых тканях мышей и других животных позволили Хюбнеру и Тодаро (Huebner, Todaro, 1969) сформулировать гипотезу вирогена, которая сыграла видную роль в прогрессе наших знаний об эндогенных вирусах. Надо сказать, что одновременно и даже несколько раньше нидерландские исследователи группы Бентвельзена, проводя генетические исследования опухолей молочных желез мышей высоко- и низкоракковых линий, по существу сформулировали понятие вирогена и привели детальные материалы, подтверждающие его существование. На модели MTV Бентвельзен и его сотрудники получили все основные современные данные о природе эндогенных вирусов: убиквитарность, вертикальную передачу интегрированного генома половыми клетками, возможность активации вируса химическими канцерогенами, провели очень тонкий генетический анализ контроля экспрессии генов интегрированного провируса и сформулировали, при-



менительно к MTV, принципиальную схему взаимоотношений клеточного генома и интегрированного провируса (см. Bentvelzen, 1972).

Однако и в значительно более ранних работах по изучению вирусов лейкозов мышей были получены факты, указывающие на убиквитарное распространение лейкозных вирусов у мышей разных линий, возможность активации лейкозных вирусов у нормальных мышей химическими, физическими и биологическими агентами, вертикальную передачу вируса и т. д. Данные такого рода были получены и обобщены Гроссом (см. Gross, 1970, 1974), Капланом (см. Kaplan, 1967), Л. А. Зильбером (1968), В. М. Бергольцем (см. 1973), Н. П. Мазуренко (1962). Лишь отсутствие адекватных моделей *in vitro* и адекватных методов определения вирусной активности и методов молекулярной биологии (гибридизация, обнаружение обратной транскриптазы и т. д.) не позволили авторам «ранних» работ стать первооткрывателями эндогенных вирусов в современном понимании проблемы.

«Новейшая» история этой проблемы была начата главным образом изучением вирусов С-типа, индуцируемых в клетках переливаемой линии нормальных эмбриональных фибробластов — BALB 3Т3 и ее многочисленных сублиний.

Обработка клональных линий таких клеток IudR, BudR или X-лучами индуцировала в них продукцию типичных вирусных частиц С-типа, содержащих обратную транскриптазу и обладающих свойствами вирусов-«помощников». Особенностью индуцированного вируса была его неспособность размножаться в клетках исходной линии BALB (В-тип клеток), однако клетки мышей линии NIH (N-тип клеток) явились перmissive системой для вируса (см. Lieber, Todaro, 1973, Aaronson et al., 1971a, c). Следовательно, эндогенный вирус клеток BALB — он был обозначен BALV-γ-1-вирус — характеризовался N-тропностью, и клетка хозяина была для него, таким образом, неpermissive системой. Клетки 3Т3 BALB, трансформированные различными онкогенными вирусами или спонтанно, часто начинали продуцировать частицы С-типа и без применения индукторов типа X-лучей или BudR, лишь в результате одного длительного пассирования. Такой «спонтанно» индуцированный вирус также характеризовался N-тропностью. Наряду с «индуцибельными» линиями клеток имеются линии, в которых индуцировать вирус известными в настоящее время индукторами не удалось. N-Тропный вирус мог быть индуцирован из первичных культур эмбриональных и взрослых тканей мышей BALB.

N-Тропные вирусы клеток BALB содержали gs-1 антиген MuLV; все попытки обнаружить онкогенные или патогенные свойства у них оказались малоубедительными (Lieber et al., 1973; Todaro et al., 1973a, b). Ааронсон и Стефенсон (Aaronson, Stephenson, 1973)

показали, что аутосомальный клеточный ген ответствен за индукцию вируса BALB-v-1 в клетках BALB.

Помимо N-тропного вируса, из клеток мышей BALB удалось выделить и B-тропный вирус. Последний, как правило, выделялся только от мышей старше двух лет (Peters et al., 1973). Впоследствии эти же авторы более детально проанализировали типы вирусов, выделяемых от мышей линии BALB и показали, что N-тропный вирус выделяется на протяжении всей жизни животного, но чаще у молодых, в то же время B-тропный вирус выделялся главным образом от старых мышей и из «спонтанных» опухолей этих мышей примерно в 75% случаев (Peters et al., 1973a, b).

Онкологический статус мышей линии BALB хорошо изучен: до года опухоли всех типов у этих мышей крайне редки; у мышей старше 24 месяцев примерно в 10% случаев возникают лимфопролиферативные опухоли, и в 20% — опухоли молочных желез (Peters et al., 1972, 1973a, b). В то время как N-тропный вирус не удалось связать с какими-либо спонтанными или индуцированными опухолями, введение поворожденным мышам линии BALB B-тропного варианта, выделенного из спонтанных опухолей, примерно вдвое повышало частоту лимфопролиферативных опухолей у таких животных по сравнению с контролем (Peters et al., 1973a, b). Предварительные данные этих же авторов показали, что B-тропный вирус *in vitro* может ускорить (или индуцировать?) «спонтанную» трансформацию клеток BALB.

Из нормальных клеток BALB не удастся «спасти» B-тропный вирус при «стандартном» действии на клетки какими-либо известными индукторами, однако Барский и др. (Barski et al., 1973) при длительной обработке BudR перевиваемой линии нормальных клеток BALB получили сублинию, клетки которой выделяли в высоком титре B-тропный вирус. Не является ли обнаружение B-тропного вируса у старых мышей или в ткани «спонтанных» опухолей доказательством мутации или рекомбинации N-тропного варианта, ведущей к изменению тропности такого вируса и к появлению у него в связи с этим свойства онкогенности для мышей родительской линии? Не связано ли проявление онкогенных потенций B-тропного вируса с приобретением им «пермиссивности» к данной системе (например, за счет увеличения инфицирующей дозы вируса в результате его размножения в клетках и органах мышей?).

При тотальном облучении X-лучами мышей C57BL/6 (B-тип мышей) у них возникают лимфомы тимуса, из которых можно выделить лейкозогенный вирус RadLV (см. выше). RadLV, выделенный непосредственно из первичных лимфом, обладал очень слабой лейкозогенной активностью. Лишь после многократных серийных пассажей патогенность его резко возросла.

Бесклеточные экстракты тимусов нормальных необлученных мышей C57BL/6 лейкомогенным действием не обладали. Так же непатогенными были экстракты тимусов эмбрионов, хотя характерные частицы С-типа у них были обнаружены. Лишь в ткани старых (500—600-дневных) необлученных мышей был обнаружен, правда, с низкой частотой, лейкомогенный вирус типа RadLV (см. Kaplan, 1967). Непатогенный вирус типа RadLV был выделен непосредственно из эмбриональных клеток C57BL при обработке их BudR (Lieberman et al., 1973); этот вирус размножался в клетках C57BL и, следовательно, был В-тропным. Описано выделение из клеток C57BL и N-тропного вируса (Odaka, 1975).

Одна из интереснейших моделей для изучения роли эндогенных вирусов в патологических процессах — мыши линии NZB. Эта линия (N-типа) характеризуется «спонтанно» возникающим характерным аутоиммунным синдромом, весьма сходным с большим коллагенозом человека — системной красной волчанкой. Во второй половине жизни у мышей линии NZB появляются лимфосаркомы и фибросаркомы с частотой, варьирующей в разных сублиниях мышей NZB. Лернер и др. (Lerner et al., 1972) из спонтанной фибросаркомы мыши линии NZB получили лимфобластодную линию, постоянно продуцирующую В-тропный вариант MuLV типа Gross. Заражение этим вирусом поворожденных F<sub>1</sub> (BALB×NZB) приводило к индукции у них опухолей и всего комплекса аутоиммунных поражений, характерных для NZB (Croker et al., 1974).

Вирусы С-типа были выделены *in vitro* из нормальных клеток высококорковых линий мышей. Наиболее подробно в настоящее время изучен вирус, индуцируемый «спонтанно» или IudR из нормальных клеток мышей линии AKR. Мыши линии AKR характеризуются чрезвычайно высокой частотой «спонтанного» лейкоза (80—90% мышей гибнет от лимфолейкоза). Этиологическим агентом «спонтанной» лейкемии AKR является вирус Гросса (иначе — вирус AKR) — «классический» пример лейкозного онкорнавируса (см. выше). Инфекционный вирус у мышей линии AKR появляется уже в тканях и органах эмбриона, примерно за неделю до рождения и затем постоянно персистирует и обнаруживается на протяжении всей постнатальной жизни. Наибольшее количество вируса удается обнаружить в костной ткани конечностей (остеоцитах и остеобластах), в матке, селезенке; в меньших количествах — в тимусе. Однако этот инфекционный вирус практически нелеймогенен. Лишь на шестом месяце жизни от таких мышей удается выделить патогенный вирус.

Из 15-дневных эмбрионов мышей линии AKR можно получить «безвирусные», не содержащие инфекционного вируса «масовые» или клональные культуры, высокочувствительные к инфекции вирусом Гросса. Часть клеток таких культур начинали «спонтанно» продуцировать вирус Гросса (1 на 10<sup>8</sup> клеток

культуры). Были получены и непродуцирующие вирус клональные культуры клеток эмбрионов мышей линии AKR. В таких безвирусных клонах индукцию вируса легко удавалось получить обработкой клеток BudR, IudR, химическими канцерогенами, облучением, мутагенами (Lowy et al., 1974; Teich et al., 1973, см. подробно Rowe, 1973). Вирус можно было индуцировать во всех исследованных клональных линиях AKR, однако максимальная частота индукции не превышала 5% клеток (примерно в 1 000 000 раз выше частоты «спонтанной» индукции вируса в этих клетках); при этом вирусный антиген индуцировался в 70% клеток клональных линий (см. Rowe et al., 1972). Во всех случаях индуцированный вирус характеризовался N-тропностью и хорошо размножался в родительских клетках мышей линии AKR (N-тип клеток). Следовательно, в этом случае клетки были перmissive для выделенного из них эндогенного вируса.

Роу и его сотрудники в течение последних 2—3 лет, применив стандартные методы генетического анализа на гибридах F<sub>1</sub> (AKR×N или B-тип мышей) в сочетании с индукцией вируса IudR в эмбриональных клетках гибридов *in vitro*, получили принципиально важные данные о механизме генетического контроля экспрессии вирусного генома в клетках мышей линии AKR. Роу и др. (см. Rowe, 1973) показали, что мыши линии АКВ несут в своем геноме два не связанных один с другим аутосомальных гена, каждый из которых определяет «положительный» фенотип (имеется в виду спонтанная продукция вируса в органах мышей). Один из этих генов — AkV<sub>1</sub> — был картирован: он локализован в седьмой паре хромосом (группа сцепления I) на расстоянии 12 генетических единиц от гена Gri-I с порядком генов C-Gri-I-AkV<sub>1</sub>.

Gri-I-генетический локус, продукт которого (изозим глюкозофосфатизомеразы) легко определяется биохимическими тестами, тесно связан с геном AkV<sub>1</sub>, что дает возможность использовать простой маркер при изучении этих локусов. Локализация второго гена — AkV<sub>2</sub> — пока не установлена.

Результаты обратного скрещивания F<sub>1</sub> гибридов показали, что локусы индукции AkV<sub>1</sub> и AkV<sub>2</sub> в гибридных клетках ответственны за индукцию только N-тропного вируса, но не В-тропного, и отсюда следует, что эти гены, возможно, могут являться структурными генами вируса Гросса. (Интересно, что в отличие от мышей линии AKR две другие высоколейкозные линии мышей C58 и C3H несут не два, а три локуса индукции.) По-видимому (см. Rowe, 1973), эти вирус-индуцирующие гены не аллельны в клеточном геноме и, быть может, представляют собой интегрированные геномы MuLV в клеточном геноме.

Если гены группы AkV<sub>1,2</sub> ответственны за индукцию инфекционного вируса в клетках AKR, то гены типа Fv-1, контролируя чувствительность клеток к инфекции тем или иным типом вируса,



определяют его распространение. Система генов Fv-1 и Fv-2 описана нами выше, и мы не будем здесь детально касаться этого вопроса. Отметим только, что, по-видимому, локус Fv-1 не локализован в геноме вируса и контролирует главным образом распространение вируса АКР, а не его индукцию (см. подробно Rowe, 1973).

Следовательно, по крайней мере три генетических локуса контролируют индукцию и инфекцию клеток линии АКР вирусом АКР: два локуса AkV<sub>1</sub> и AkV<sub>2</sub> ответственные за индукцию вируса, гены типа Fv-1, контролирующие его распространение, и, по-видимому, система генов H2 (или участок Ig-1), связанная с иммунной реактивностью мышей (см. Lilly, Pincus, 1973).

Вирус АКР не единственный N-тропный эндогенный вирус, патогенный для собственного хозяина. Мыши линии SWR/J (N-тип мышей) характеризуются высоким процентом спонтанных ретикуллоцелочных опухолей. От таких мышей был выделен N-тропный вирус D-1 MuLV, который при введении новорожденным мышам этой линии или линии A вызывал опухоли и лимфатические лейкемии. «Кривая» выделения вируса из экстрактов селезенки здоровых мышей SWR/J имела характерный вид: от эмбрионов вирус выделить не удалось, от 1—2-месячных мышей D-1MuLV выделялся в 20% случаев, от 4—8-месячных (начало появления спонтанных опухолей) — в 45—60%, от 12-месячных мышей — в 20% случаев. Антигенно D-1MuLV был близок вирусу Гросса. Индукция опухолей вирусом D-1 у мышей линии A (B-тип) была весьма низка (около 20%). Однако лейкозогенное действие D-1 на B-тип мышей косвенно подтверждается более ранними данными об индукции лейкозов бесклеточными экстрактами опухолей SWR/J у мышей линии BALB. Очевидно, что вирус D-1MuLV близок, хотя и не идентичен вирусу Гросса (см. Chang et al., 1974).

Интересно отметить, что хотя этот факт и не имеет удовлетворительного объяснения, N-тропный вирус удается выделить из N- и B-типа клеток, в то время как B-тропный вирус обнаруживается только в B-типе клеток. В то же время есть линии мышей (например NIH, DDD), из клеток которых не удается выделить при обработке BudR или IudR N- или B-тропные вирусы.

На основании генетических исследований Одака (Odaka, 1975) разбил известные линии мышей на 5 групп: 1) Fv-1<sup>bb</sup>; N- и B-тропный вирус — положительные, 2) Fv-1<sup>nn</sup>, вирус — отрицательные, 3) Fv-1<sup>bb</sup>, вирус — отрицательные, 4) Fv-1<sup>nn</sup>, N-тропный вирус — положительные и 5) Fv-1<sup>bb</sup>, B-тропный вирус — положительные.



*Ксенотропные вирусы мышей*

N- и В-тропные эндогенные вирусы, выделенные из нормальных клеток мышей, оказались не единственными эндогенными вирусами С-типа, находящимися в интегрированной форме в таких клетках. Еще в первых работах по индукции BudR и IudR эндогенных вирусов С-типа из клеток BALB было показано, что наряду с N-тропным вирусом из таких клеток может быть «спасен» и вирус, который не растет в N-типе (или В-типе) мышинных клеток, но может размножаться в клетках крыс — вирус BALB-v-2. Генетические локусы, ответственные за индукцию в клетках N-тропного вируса и вируса, растущего в клетках крыс, были различны (см. Aaronson, Stephenson, 1973). Впоследствии вирус BALB-v-2-типа и сходные с ним вирусы были выделены и охарактеризованы более детально. Из нормальных клеток разных линий мышей удалось индуцировать и выделить особый класс эндогенных онкорнавирусов С-типа, характеризующихся инфекциозностью для клеток немышиного происхождения, например, крыс, кроликов и т. д. (отсюда и название — ксенотропные). Клетки мышей как В-, так и N-типа были полностью непермиссивны для ксенотропных вирусов (Todaro et al., 1973; Levy, 1973; Benveniste et al., 1974c; Lieber et al., 1974). Линия SIRC клеток роговицы кролика оказалась одной из наиболее чувствительных систем для размножения ксенотропных вирусов мышей — отсюда и другое название их: S-тропные вирусы (Lieber et al., 1974). Следует подчеркнуть, что SIRC является непермиссивной системой для размножения как В-, так и N-тропных вирусов мышей (Benveniste et al., 1974) и, следовательно, селективна для отбора S-тропных вариантов. Ксенотропные вирусы были индуцированы в N- и В-типах нормальных клеток мышей разных линий, в том числе и диких мышей, аналогами тимидина (Lieber et al., 1974; Benveniste et al., 1974), ингибиторами синтеза белка (Aaronson, Dunn, 1974) и реакцией graft-v-host (Sherr et al., 1974b). При этом, ингибиторы синтеза белка обладают определенной избирательностью индукции для ксенотропных вирусов мышей.

Ксенотропные вирусы значительно «легче» индуцируются из нормальных клеток, чем из лейкемических или трансформированных (в отличие от N- и В-тропных вирусов). В ряде случаев опухолевые клетки вообще утрачивали способность выделять S-тропный вирус (Lieber et al., 1974). Исключение — вирус, спонтанно продуцирующийся в громадных количествах у мышей линии NZB. Так как мышинные клетки полностью непермиссивны для S-тропных вирусов, спонтанная продукция S-тропного вируса клетками NZB представляет собой уникальную систему для изучения клеточных и вирусных факторов контроля экспрессии генома S-тропного вируса. Способность клеток NZB продуцировать

S-тропный вирус частично доминантен в  $F_1$  гибридных клетках (Aaronson, Stephenson, 1974).

Локусы индукции ксенотропных вирусов независимы от локусов индукции N-тропных вирусов в клетках BALB (Aaronson, Stephenson, 1973). Видоспецифический антиген (gs-1 MuLV) и обратная транскриптаза ксенотропных вирусов идентичны B- и N-тропным вирусам мышей (см. Benveniste et al., 1974).

Еще одной особенностью ксенотропных вирусов была поразительная легкость и частота их индукции из клеток селезенки нормальных мышей в смешанных культурах или от мышей с graft-v-host реакцией. S-Тропные вирусы были выделены из селезенки мышей линии AKR, BALB, DBA, C57BL, CBA, C-58. Из селезенки некоторых линий удалось выделить одновременно два типа вируса — ксенотропный и N- или B-тропный вирус.

Наиболее часто ксенотропные вирусы выделялись из селезенки старых мышей, от молодых мышей линии BALB ксенотропный вирус выделить не удалось. Интересно, что в стандартных препаратах лейкозных вирусов мышей, способных расти как в N-, так и B-типах клеток, ксенотропные вирусы обнаружить не удалось (Lieber et al., 1974). Активация лейкозного вируса S-типа в смешанных культурах селезенки была описана Хиршем и др. (Hirsch et al., 1972).

Активация ксенотропных вирусов в смешанных культурах селезенки или выделение их от мышей с graft-v-host реакцией ставит вопрос о роли этих вирусов в лейкомогенезе. Известно, что у гибридов  $F_1$  (линий мышей с низкой частотой лейкемии) с индуцированной введением аллогенных клеток хронической graft-v-host реакцией в значительном количестве возникают лимфоретикулярные опухоли; из фильтратов тканей таких животных можно выделить вирус, вызывающий лейкемию (см. Armstrong et al., 1973). Не известно, однако, имеет ли ксенотропный вирус какое-либо отношение к этому.

Спектр чувствительных клеточных линий для ксенотропных вирусов поразительно широк и включает в себя клетки человека, кошки, норок, крупного рогатого скота, собак, обезьян и даже птиц (см. Levy, 1975).

ДНК — РНК гибридизация показала, что ксено- и N- и B-тропные вирусы имеют различные последовательности оснований в своих РНК-геномах; общность составляет около 40% (Benveniste et al., 1974; Callahan et al., 1974).

Выше указывалось, что мышечные клетки являются полностью непермиссивной системой для ксенотропных вирусов мышей. Непермиссивность доминантна, так как гибридные клетки мышья — крысы также являлись непермиссивной системой для ксенотропных вирусов. Интересно, что такие гибридные клетки были пермиссивны для B- или N-тропных мышечных вирусов в зависимо-

сти, естественно, от типа мышинных клеток: N-типа или B-типа (Scolnick, Parks, 1974b).

К ксенотропным вирусам относится вирус AT-124 — онкорна-вирус С-типа, выделенный из клеток RD (рабдомиосаркомы человека) после пассажей их на мышах линии NIH, обработанных иммунодепрессантами. Выделенный вирус хорошо рос в различных культурах клеток человека и приматов, но плохо размножался в мышинных клетках (Todaro et al., 1973). Однако в отличие от вируса RD-114 (эндогенный вирус кошек, выделенный из этой культуры, — см. ниже) gs-1 антиген и обратная транскриптаза вируса AT-124 были идентичны лейкозным вирусам мышей. Однако РНК вируса AT-124 имела лишь невысокую степень гомологии с нуклеиновой кислотой «стандартного» вируса Раушера (около 25%) (Benveniste, Todaro, 1973). Не исключено, что в случае AT-124 имеет место рекомбинация мышинного вируса (эндогенного или «экзогенного») с эндогенным вирусом человека. Ксенотропность вируса AT-124 подчеркивалась и тем, что гибридные клетки — мышь — человек были полностью непермиссивны для этого вируса; лишь те гибриды, где количество мышинных хромосом уменьшалось до минимума, оказались в состоянии поддерживать репликацию AT-124 (см. Gazdar et al., 1974a). Эти факты интересны еще и в том отношении, что линия NIH (N-тип клеток) считается или считалась стандартным примером безвирусной линии мышей. Действительно, стандартными методами индукции BudR, IudR не удавалось выделить из нормальных клеток NIH какой-либо эндогенный вирус.

Фаулер и др. (Fowler et al., 1972, 1973) опубликовали сообщения об активации *in vivo* gs-антигенов и обратной транскриптазы MuLV природными и синтетическими эстрогенами, а также облучением в ткани матки овариоэктомированных мышей линии NIH.

Экспрессия этих двух вирусных маркеров в ткани матки зависела от линейной принадлежности мышей: у мышей C57BL, характеризующихся крайне низкой частотой опухолей, активацию эстрогенами gs-антигенов MuLV в ткани матки получить не удалось. Gs-Антиген ткани матки NIH содержал обе антигенные детерминанты gs-1 и gs-3.

Следует отметить следующее: групповой антиген и обратная транскриптаза, индуцированные в ткани матки мышей линии NIH, по своему молекулярному весу были больше, чем аналогичные белки стандартных препаратов MuLV (Strickland et al., 1974). Пока не установлено, с чем связаны эти отличия — с особенностями эндогенного вируса NIH или с особенностями ткани. При этом у мышей линии NIH индуцировались только антигенные компоненты эндогенного вируса; частицы С-типа обнаружить при этом не удалось. Отсюда следовало, что «безвирусные» клетки

мышей линии NIH содержат эндогенную вирусную информацию. Это было подтверждено и прямым выделением из клеток NIH ксенотропных онкорнавирусов С-типа (Levy, 1973). Вводя иммунодепрессированным мышам NIH клетки человеческих опухолей, Стефенсон и др. (Stephenson et al., 1974b) выделили несколько штаммов ксенотропных онкорнавирусов С-типа, способных размножаться в клетках крыс и человека, но содержащих *gs-1*MuLV. Возможно, что АТ-124 (описанный выше), А-204, А-549, А-673, А/LAB-496 (новые штаммы ксенотропных вирусов клеток NIH) представляют собой смеси или рекомбинанты эндогенных вирусов мышей и человека. Иммунологический анализ ксенотропных вирусов клеток NIH показал, что в реакции нейтрализации эти вирусы были идентичны BALB-v-2, но типоспецифический антиген р-12 этих вирусов был отличен от р-12 BALB-v-2 (Stephenson et al., 1974a, b). Отмечено значительное сходство ксенотропного вируса клеток NIH с ксенотропным вирусом мышей линии NZB (Stephenson, Aaronson, 1974b).

Антигенно в реакции нейтрализации ксенотропные вирусы полностью отличны от MuLV группы FMR. Однако ксенотропные вирусы нейтрализуются сывороткой анти-MuLV Gross. В то же время сыворотка мышей NZB, нейтрализующая ксенотропные вирусы, не нейтрализует MuLV Gross (Aaronson, Stephenson, 1974; Stephenson et al., 1974). Как показали серологические исследования, ксенотропные вирусы разных линий мышей, по-видимому, принадлежат к одному серо-фенотипу, однако ксенотропные вирусы клеток линий BALB и NIH, по-видимому, различаются между собой по многим признакам (см. ниже).

Из данных о ксенотропных, N- и В-тропных вирусах мышей очевидно, что нормальные клетки большинства линий мышей содержат по крайней мере два разных типа эндогенных вирусов. Один тип (N-, В-тропные), репликация которых четко контролируется генами системы Fv-1, индуцируются аналогами нуклеиновых оснований или спонтанно. Частота спонтанной индукции N- или В-тропных вирусов резко возрастает в опухолях или клетках, трансформированных какими-либо агентами.

В отличие от этого чувствительность клетки к S-тропным вирусам не детерминируется системой генов Fv-1, мышинные клетки полностью непермиссивны для них, они обладают тропностью к «ксеноклеткам», опухолевая конверсия или трансформация клетки не способствует, а, наоборот, подавляет индукцию ксенотропных вирусов, характер кривой индукции — более ранний — отличается от аналогичных кривых индукции В-тропных вирусов и, наконец, имеется избирательность действия индукторов. Все это говорит о том, что уровни контроля клеткой В-, N- и ксенотропных вирусов мышей различны (Aaronson et al., 1974). По-видимому, эти два типа эндогенных вирусов могут взаимодействовать:



ксенотропный вирус, частично снимает при индукции резистентность клеток к N-тропному вирусу в непермиссивных для этого вируса системах, контролируемых локусом Fv-1 (Stephenson et al., 1974d).

\* \* \*

«Биологические» данные о присутствии вирусов С-типа в нормальных мышечных клетках получили полное подтверждение и при использовании методов молекулярной гибридизации вирусной нуклеиновой кислоты или <sup>3</sup>H-ДНК продукта ее с дезоксирибонуклеиновой кислотой клетки (см. подробно, Gelb et al., 1973; Chattopadhyay et al., 1974, 1975; Callahan et al., 1974).

В геноме нормальных клеток мышей (но не клеток крыс, цыплят, обезьян) содержатся нуклеотидные последовательности, комплементарные ДНК MuLV, в количестве около 10 вирусных геномов на клетку. Вируспецифическая ДНК MuLV находится в ДНК хромосом в ковалентно связанной форме. Важно отметить, что количество вируспецифической ДНК в геноме клеток мышей разных линий было идентичным вне зависимости от онкогенного статуса линии (высоколейкозные, низколейкозные или безлейкозные мыши NIH) (Gelb et al., 1973).

Чаттопадхай и др. (Chattopadhyay et al., 1974) сравнили содержание вируспецифической ДНК MuLV в геноме нормальных клеток двух линий — АКР (высоколейкозная линия) и НИН (безлейкозная линия). При ДНК-ДНК гибридизации авторы показали, что в геноме клеток АКР, как продуцирующих, так и непродуцирующих вирус, содержится полный геном MuLV в количестве около четырех копий на гаплоидный геном. При этом в геноме клеток АКР обнаруживалось два отличающихся один от другого по кинетике реассоциации набора вируспецифической ДНК. Один из них представлен десятью копиями, другой — четырьмя. Не исключено, что избыток одного из них представляет собой или неполный вирусный геном, или другой, отличный от MuLV АКР геном эндогенного вируса. Позднее эти же авторы показали, что число полных вирусных геномов (первого и второго вместе) в клетках мышей высоколейкозных линий выше, чем низколейкозных; была отмечена также прямая корреляция между числом полных вирусных геномов в клеточной ДНК и частотой индукции и количеством инфекционного вируса; вируспецифическая ДНК локализуется главным образом в уникальных последовательностях клеточной ДНК.

Анализ «безвирусных» клеток мышей НИН (безлейкозная линия) показал, что в геноме этих клеток содержится только один из двух наборов (с неполной — примерно 50%-ной степенью гибридизации) генома MuLV (около 2/3 полного генома) в количе-

стве примерно 15 копий на гаплоидный набор. Отсюда следует, что или в геноме N1H содержится неполный вирусный геном, или же эти клетки содержат геном(ы) другого эндогенного вируса мышей, отличного от AKR.

Лави и др. (Lowy et al., 1974) недавно подтвердили корреляцию между числом полных копий MuLV AKR в геноме клетки и свойством клеток продуцировать вирус С-типа. Присутствие в геноме клеток двух разных наборов вирусспецифической ДНК — более быстро и менее быстро реассоциирующих — позволило детализировать картину нормальной интеграции. Клетки мышей высоколейкозных линий содержат множественные копии обоих наборов ДНК MuLV в равном количестве, низколейкозных — содержат также оба типа набора ДНК MuLV, но в меньшем количестве, чем высоколейкозные. Оба типа мышей содержат около 10 геномов быстро реассоциирующей ДНК, однако у мышей низколейкозных линий уменьшено число медленно реассоциирующих наборов ДНК. Клетки безвирусных линий мышей утрачивали этот последний тип ДНК.

Клетки  $F_1$  (AKR  $\times$  N1H) содержат половину вирусспецифических уникальных последовательностей, комплементарных РНК MuLV AKR. При анализе клеток мышей линии N1H, конгенных с AKR по AkV-1-локусу, было показано, что ДНК таких клеток содержит вирусспецифические нуклеотидные последовательности, комплементарные MuLV-G в количестве, аналогичном для  $F_1$  (AKR  $\times$  N1H). Это прямо говорит о том, что AkV-1-локус является частью вирусного генома. При этом было показано также, что AkV-1-локус составляет примерно половину генома вируса AKR (Chattopadhyay et al., 1975).

Коллаган и др. (Callahan et al., 1974) сравнили методом ДНК:РНК гибридизации три типа вирусов нормальных клеток мышей линии BALB — ксенотропные, N- и В-тропные. Эти типы вирусов имеют сходные антигенные детерминанты р-30 и обратную транскриптазу. Авторы показали, что, несмотря на наличие гомологичных нуклеотидных последовательностей в геномах всех трех типов эндогенных вирусов, имелись четкие, индивидуальные для каждого типа вируса различия между ними.

Транскрипция комплементарных вирусу ДНК в геноме нормальных клеток мышей изучена мало. Так, в клетках линии BALB 3Т3, не продуцирующих вируса, обнаруживалась в цитоплазме вирусспецифическая РНК. Эта РНК составляла лишь часть вирусного генома (от 3 до 11% информации, обнаруживаемой в вируспродуцирующих культурах). Надо подчеркнуть, что в таких клетках постоянно продуцируется gs-1 антиген (р-30) MuLV в количестве около 50 нг на 1 мг белка, и что в этих клетках содержится полная генетическая информация по крайней мере двух различных эндогенных вирусов мышей. Интересно, что

трансформация таких клеток химическими канцерогенами, ДНК-содержащими вирусами или спонтанная (не ведущая к продукции С-типа вируса) в 2—5 раз увеличила количество вирусспецифической РНК (Benveniste et al., 1973a).

Изучение экспрессии генов эндогенных вирусов в нормальной «безвирусной» клетке начато давно; по существу, первые работы по эндогенным вирусам посвящены именно этому вопросу. Касались они главным образом экспрессии р-30 (gs-1 детерминанты его) в органах и тканях нормальных мышей разных линий. Громадный материал, накопленный по этому вопросу (см. Abelev, Elgort, 1970; Huebner et al., 1970) в основном в РСК или иммунодиффузии, можно обобщить следующим образом: gs-1 антиген постоянно обнаруживается в ткани селезенки мышей высоко- и низкоракковых линий. У мышей низколекозных линий (BALB) первоначально gs-1-антиген обнаруживается у эмбрионов, затем количество его после рождения и в первые 5—6 месяцев значительно уменьшается, а с 7—9 месяца жизни прогрессивно нарастает, достигая максимума к 1,5—2-годовалому возрасту — к моменту наибольшей частоты возникновения спонтанных опухолей; это часто сочеталось с продукцией вируса С-типа. Особо мы хотели отметить и тот «старый» факт, что в тимусе новорожденных мышей низколекозной линии Swiss были обнаружены электропониомикроскопические частицы С-типа (Rich, Johns, 1968). С возрастом число их резко уменьшалось. У мышей высоколекозных линий gs-1-антиген обнаруживался постоянно. gs-1-Антиген был обнаружен и у мышей различных сублиний NIH и C57BL, спонтанный лейкоз у которых практически не наблюдается.

В опухолях мышей разных линий (в том числе и у диких мышей), спонтанных или индуцированных химическими канцерогенами, gs-1-антиген обнаруживался в 100% случаев; интересно при этом, что в соединительной ткани, окружающей «gs<sup>+</sup>» опухоль, gs-1-антиген не был найден. gs-1-Антиген обнаружен как в продуцирующих, так и в непродуцирующих вирус опухолей (см. Huebner, 1973).

У мышей высоколекозных линий продукция gs-1-антигена была обнаружена в лимфоидной ткани тимуса и селезенки, в ткани плаценты, молочных желез, яичек, яичников. gs-1-Антиген обнаруживался и в молоке мышей высоколекозных линий (см. Pattengale et al., 1974).

Была отмечена прямая корреляция между степенью экспрессии gs-1-антигена в ранние сроки после рождения и частотой опухолей, возникающих в поздние сроки жизни мышей (см. Huebner, 1973).

Выделение чистых вирионных белков в препаративных количествах, получение моноспецифических сывороток к этим белкам и использование радиоиммунологических тестов позволило начать

изучение дискретной экспрессии в нормальных клетках разных генов интегрированного генома. Полученные сейчас данные еще весьма неполны и касаются ограниченного числа белков, однако даже в таком виде они представляют значительный интерес. Работы эти посвящены главным образом экспрессии в клетках p-30 и gr-69/71.

Соотношение этих белков в вирионе равно 2:1 (из расчета 10—20% p-30 и 5—10% gr-69/71 от всех белков вириона). При анализе ткани селезенки мышей высоколейкозных линий было показано, что соотношение этих белков совпадает с обнаруженным в вирионе и составляет 100—200 нг p-30 и 100—50 нг gr-69/71 на 1 мг тканевого белка.

У мышей низколейкозных линий соотношение этих белков в ткани селезенки менялось и возможны были варианты: сравнительный избыток p-30 (но в значительно меньшем абсолютном количестве, чем у мышей высоколейкозных линий) и следовые количества gr-69/71 (мыши линии BALB), обратное соотношение — избыток gr-69/71 и низкое содержание p-30 (линии B/10, DBA/2); у мышей линии C57BL при низкой продукции обоих белков соотношение их было равно 1:1. У мышей NZB количество gr-69/71 составляло около 700—800 нг на 1 мг белка селезенки (p-30 около 200 нг), т. е. более чем в 10 раз превышало количество этого белка у линии AKR, в 30—40 раз — у C57BL и в 1000 раз — у BALB. Анализ продукции обоих типов белков у F<sub>1</sub> гибридов разных линий показал, что отсутствие или низкая продукция gr-69/71 доминантны. Из этих данных следует также, что экспрессия вирусных белков p-30 и gr-69/71 в нормальной клетке не координирована. Во всех случаях максимальная продукция обоих белков наблюдалась в селезенке, минимальная — в печени (Strand et al., 1974; Yoshiki et al., 1974).

Мыши линии C57BL10Sn (низколейкозная линия) несут доминантный ген(ы) репрессирующий синтез gs-1 антигена в клетках гибридов C57BL10Sn с высоко- или низколейкозной линией. Этот ген(ы) оказал репрессирующий эффект и на индукцию вируса С-типа, и индукцию лимфом у гибридов.

Анализ синтеза p-30 и gr-69/71 в селезенках конгенных линий мышей дает основание думать, что H-2 локус может принимать участие в регуляции синтеза p-30.

Использование F<sub>1</sub> гибридов и различных конгенных линий в такого рода анализе, несомненно, даст очень важные сведения о генах, регулирующих экспрессию разных вирионных белков. Так, сублиния мышей BALB-nude (безтимусные) в отличие от родительской линии имела высокий уровень синтеза gr-69/71. Отсюда не исключено, что иммунологическая система организма может участвовать в регуляции экспрессии белков эндогенного вируса. Интересно, что в селезенках «безвирусных» линий мы-



шей (NIH) р-30 также был обнаружен, однако gp-69/71 обнаружить не удалось. Позднее Стефенсон и др. (Stephenson et al., 1974c) показали, что в безвирусных клетках мышей разных линий (в том числе и NIH) *in vivo* и *in vitro* продуцируется и другой вирионный белок С-типа частиц р-12. Соотношение р-30 и р-12 в нормальных безвирусных клетках NIH и BALB резко изменено по сравнению с соотношением этих белков в вирионе, и продукция р-30 была непропорционально высокой.

На поверхности лимфоидных Т-клеток мышей определенных линий ( $G_{1X}^+$ ) локализован характерный антиген —  $G_{1X}$ . Способность образовывать его наследуется по менделевскому типу, и этот антиген индуцируется в клетках лимфом  $G_{1X}$ -линий.

В частности  $G_{1X}$ -антиген в норме обнаружен на поверхности лимфоидных клеток мышей линий AKR и 129. Мыши последней линии «безвирусные» — не удавалось обнаружить или индуцировать С-тип частиц в клетках мышей этой линии. Стокерт и др. (Stocker et al., 1972) показали, что экспрессия  $G_{1X}$ -антигена у мышей линии 129 контролируется генетически. Стрэнд и др. (Strand et al., 1974), анализируя конгенных мышей линии 129, отрицательных по  $G_{1X}$ -антигену, установили, что у таких мышей отсутствует или очень снижен по сравнению с мышами линии 129 ( $G_{1X}^+$ ) уровень р-30 и gp-69/71. Отсутствие р-30 и gp-69/71 у мышей конгенной линии 129 ( $G_{1X}$ ) наследовалось как рецессивный признак, так как клетки  $F_1$  гибридов их с AKR или DBA содержали оба эти белка. Из этих данных следует, что доминантный ген GV-1, контролирующий синтез  $G_{1X}$ -антигена и отсутствующий у мышей 129 ( $G_{1X}$ ), может быть геном эндогенного вируса или быть тесно связанным с генами, ответственными за синтез gp-69/71 и р-30. Последующие работы полностью подтвердили это предположение: три группы авторов показали, что  $G_{1X}$ -антиген входит в состав gp-69/71 (Obata et al., 1975; Delvillano et al., 1975; Tung et al., 1975). Не исключено, что аналогичная картина имеет место и в случае другого поверхностного клеточного антигена PC1. Антиген PC1 обнаруживается на поверхности нормальных плазматических клеток, клеток печени, почек, мозга и лимфоузлов мышей определенных линий, обозначенных как PC<sup>+</sup>-линии. Как PC<sup>+</sup>-, так и PC<sup>-</sup>-линии мышей спонтанно могут образовывать антитела к PC1-антигену. Синтез антигена PC1 детерминируется менделевским типом наследования. Плазмоцитомы, индуцированные минеральным маслом у мышей как PC<sup>+</sup>-, так и PC<sup>-</sup>-линий, содержат PC1-антиген на поверхности опухолевых клеток. При культивировании клеток плазмоцитом *in vitro* они начинают продуцировать частицы С-типа. Имеется большое количество не прямых данных, свидетельствующих о том, что PC1-антиген индуцируется этим вирусом (см. Aoki, 1974).

\* \* \*

Индукция С-типа вирусов мышей различными химическими, физическими и биологическими факторами *in vivo* и, как следствие этой индукции, возникновение опухолей и лейкозиев — хорошо известные факты, и частично мы касались этого в главе 5. Механизм индукции вируса *in vivo* крайне сложен для анализа. Многокомпонентность этого процесса очевидна и включает нарушения «регуляции» эндогенного вируса на внутриклеточном уровне, на уровне клетки и на уровне организма. В последнем случае, по-видимому, могут принимать участие и факторы иммунитета (см. ниже).

Интересно, что при облучении мышей или обработке их канцерогенами в дозах, ведущих к индукции лимфом и сарком, спустя короткий период после такого воздействия в тканях и органах подопытных мышей наблюдается резкое увеличение инфекционного вируса С-типа. Это очень напоминает индуктивный эффект этих воздействий на клетки *in vitro* (Ball, McCarter, 1971).

Более детально изучен феномен индукции эндогенных вирусов *in vitro*. По-видимому, при действии BudR, IudR требуется непосредственное включение этих аналогов в ДНК клетки (см. Theich et al., 1973). Множественные одонитевые разрывы молекулы нуклеиновой кислоты, включившей в свой состав аналог, как полагают, являются одним из существенных факторов активации («спасения») интегрированного генома эндогенного вируса. Индукция вируса при этом не требует удаления из среды BudR (в отличие, например, от индукции в опухолевых клетках EBV), что связано с тем, что ДНК-зависимый этап не входит в цикл активации эндогенного вируса. Обратная транскриптаза, по-видимому, не участвует в процессе активации эндогенных вирусов.

Кортикостероиды (в особенности дексаметазон) в 5—25 раз усиливали процесс индукции эндогенного вируса (Paran et al., 1973). Стимулирующее действие кортикостероидов было постиндукционным или посттранскрипционным; обработка клеток BudR или IudR была при этом необходимым условием (Wu et al., 1974). Кордиципин — ингибитор синтеза полиА-участков РНК и интерферон подавляли стимулирующее действие кортикостероидов (Tenant et al., 1973).

Активация эндогенных (ксенотропных) вирусов ингибиторами синтеза белка (циклогексимидом) требует *de novo* синтеза РНК во время воздействия ингибитором, но не после этого воздействия (Aronson et al., 1974a, Wu et al., 1974).

Авторы полагают, что блок синтеза ксенотропного вируса в мышьяной клетке обусловлен лабильным белком, который или подавляет транскрипцию вирусной РНК или, действуя на посттранскрипционном уровне, разрушает эту РНК.

Активирующим действием на эндогенные вирусы обладают не только аналоги нуклеиновых кислот или ингибиторы синтеза белка. В частности такой эффект описан и для бактериальных липополисахаридов (Mironi, Schumann, 1975).

Даже простое кратковременное культивирование *in vitro* лимфоцитов тимуса, селезенки и лимфоузлов мышей C57BL индуцировало синтез gs-антигена (но не вирусных частиц) в клетках. Ингибиторы синтеза ДНК, РНК и белка подавляли индукцию синтеза gs-антигена (Lonai et al., 1974).

Обращает на себя внимание значительно бóльшая частота обнаружения С-типа онкорнавирусов в перевиваемых и трансформированных клетках по сравнению с нормальными однослойными культурами. В цитированной выше работе Бенвенисте и др. (Benveniste et al., 1973) показано, что в трансформированных культурах, даже не продуцирующих С-тип вирионы, в 2—5 раз увеличено количество вирусспецифической РНК. Одно из возможных объяснений вытекает из работ Ааронсона и др. (Aaronson et al., 1974b), показавших, что продукция индуцированного в В-типе клеток N-тропного вируса (непермиссивная система) может быть значительно пролонгирована, если клетки после обработки BudR культивировать в условиях постоянного деления. В то же время в неделящихся клетках продукция вируса быстро прекращалась. Это хорошо согласуется и с более ранними данными о том, что синтез и продукция онкорнавирусов С-типа коррелируют с определенными фазами клеточного цикла (см., например, Temin, 1972); в хронически инфицированных MuLV клетках синтез или подавление образования вирусных антигенов синхронизированы с определенными фазами клеточного цикла (см. Panem, Schauf, 1974). Интересно, что кривые роста ксенотропного вируса, одновременно индуцированного с N-тропным вирусом в тех же клетках BudR, не зависели от стадии роста культуры. Таким образом, налицо еще одно отличие контроля экспрессии N-, В- и S-тропных вирусов в клетке (см. Aaronson et al., 1974b).

\* \* \*

Роль иммунитета при эндогенной вирусной инфекции мышей изучена еще недостаточно, хотя важность «иммунологического» аспекта проблемы очевидна. Основные вопросы, которые требуют решения в этом плане, по-видимому, можно сформулировать следующим образом: связана ли экспрессия генов эндогенных вирусов с какими-либо иммунными сдвигами в организме? Играет ли иммунная реакция организма (если она есть) какую-либо роль в той патологии, за которую могут быть ответственны эндогенные вирусы? Иначе говоря, не может ли быть иммунная реакция одним из «уровней» контроля эндогенной вирусной информации?

Синтез многих белков эндогенных вирусов постоянно идет уже в эмбриональном периоде и на протяжении всей постнатальной жизни животного и, следовательно, а priori может приводить к иммунологической толерантности мышей на антигенные детерминанты этих белков. Это положение получило, казалось бы, полное подтверждение в случае р-30 MuLV (как gs-1, так и gs-3 его детерминанты). Все попытки обнаружить антитела к этому белку в сыворотках мышей, иммунизированных различными препаратами MuLV, дали отрицательный результат (Huebner et al., 1970). В то же время мыши дают достаточно сильный иммунный ответ по крайней мере на некоторые типоспецифические антигены лейкозных вирусов (например, gp-69/71), играющие роль в реакции нейтрализации, и (или) на вирусиндуцированные клеточные антигены. Однако необходимы были прямые доказательства существования иммунной реакции на антигены именно эндогенных вирусов.

В 1966 г. Аоки и др. (Aoki et al., 1966), а впоследствии и другие авторы обнаружили в сыворотках нормальных мышей низколейкозных линий антитела к клеточным вирусиндуцированным антигенам типа Гросса. Впоследствии такие «природные» антитела к мембранным антигенам вируса Гросса (вируснейтрализующие) были обнаружены также у мышей линии NZB, для которой вообще характерны резко повышенный гуморальный ответ и «поломка» толерантности к многим собственным антигенам, и в сыворотках мышей линии AKR (см. Aoki, 1974).

Использование высокочувствительных методов иммунологического анализа в сочетании с препаративным выделением индивидуальных белков вирионов позволило получить более ясную картину спектра природных антител к антигенам эндогенных вирусов у мышей разных линий. Так, Батзинг и др. (Batzing et al., 1974), изучая низколейкозные F<sub>1</sub> гибриды (C57BL × C3H) — B6C3F<sub>1</sub>, обнаружили методом иммуноэлектронной микроскопии в их сыворотках антитела к мембранным антигенам MuLV-G. Продолжая эти исследования, Игле и др. (Ihle et al., 1974) в сыворотках мышей разных линий (BALB, B6C3F<sub>1</sub>, C3H, C57BL) обнаружили антитела к gp-69/71, gp-43 и, в меньшем количестве, антитела к р-19 и р-15 MuLV-G. Все эти данные показывают, что в сыворотках нормальных мышей низко- и высоколейкозных линий обнаруживаются антитела к антигенам наружной мембраны эндогенных MuLV. Значение этого гуморального иммунного ответа в патогенезе лейкоза или в контроле экспрессии генов эндогенных вирусов неясно. У линий мышей с низкой частотой спонтанного лейкоза уровень природных антител выше, чем у высоколейкозных линий. Отмечается значительное падение титра этих антител у старых животных (в сроки появления «спонтанных» лимфом) (Ihle et al., 1973; Hanna et al., 1972).



В недавней работе группа авторов (Lee et al., 1974) подробно изучила радиоиммунологическим методом спектр сывороточных антител у мышей В6С3F<sub>1</sub>. Авторы обнаружили во фракции 19S сыворотки этих мышей антитела к трем белкам наружной мембраны вируса АКР—gp-68, gp-43 и p-15. Во фракции же 7S обнаруживались антитела только к p-15. Новинский и Кэхлер (Nowinski, Kaehler, 1974), используя аналогичный радиоиммунологический метод, обнаружили антитела к вирусу АКР в сыворотках мышей практически всех инбредных линий. По-видимому, это были антитела против типового антигена наружной мембраны вируса.

У старых мышей низко- и высоколейкозных линий описано специфическое неопухоловое заболевание — гломерулонефрит, патогенез которого связывают с аутоиммунными или иммунопатологическими процессами на том основании, что в пораженных почках обнаруживают депонирование комплекса антиген-антитело с сорбированным на таком комплексе С<sub>3</sub>-фракции комплемента. Первоначальное обнаружение иммунных комплексов при тяжелом гломерулонефрите мышей линии NZB с очень широким спектром генетически детерминированных аутоиммунных синдромов (Dixon et al., 1971) послужило стимулом и для исследования этого феномена у других линий мышей. В иммунных комплексах, выделенных из почек мышей NZB, наряду с антителами к ДНК и эритроцитам были обнаружены антитела к различным компонентам MuLV, в том числе и вируснейтрализующие антитела и, возможно, антитела к p-30. Йошики и др. (Yoshiki et al., 1974) показали, что в почках мышей NZB откладывается gp-69/71 в комплексе с антителами; количество и локализация этого комплекса в почках были пропорциональны тяжести заболевания.

У мышей линии АКР в элюатах антител из пораженных почек лейкозных мышей были обнаружены комплемент-связывающие антитела, по-видимому, к внутривирioнным компонентам, антитела к клеточным вирусиндуцированным поверхностным антигенам, комплексы мышинного иммуноглобулина, С<sub>3</sub>-фракции комплемента и gs-1 и gs-3 антигена MuLV. В подобных элюатах найдены специфические антитела и к обратной транскриптазе MuLV. Обнаруженные антитела находились во фракции IgG и IgM глобулинов (см. Oldstone et al., 1972; Yoshiki et al., 1974). Аналогичные описанным выше почечные поражения были обнаружены и у мышей, неонатально инфицированных MuLV, и у старых мышей низколейкозных линий. В обоих случаях в пораженных почках были найдены комплексы антиген-антитело, одним из компонентов которых были антитела к вирусным и вирусиндуцированным антигенам. У мышей линии С57ВL в таких комплексах были найдены антитела к вирусиндуцированным антигенам

или к антигенам вируса, в том числе обладающие нейтрализующей активностью (см. Porter et al., 1973). Антитела локализовались во фракциях IgG и IgM иммуноглобулинов. У некоторых линий мышей антитела к компонентам MuLV (в основном, к мембранным) в почечных элоатах составляли до 70% всех антител. В иммунных комплексах в почках электронномикроскопически были обнаружены и частицы С-типа.

У мышей линии RFM (см. Ihle et al., 1974) была показана обратная корреляция между частотой спонтанных лейкозией и выраженностью признаков гломерулонефрита; у высоколейкозных мышей АКР такой корреляции не наблюдалось (Pascal et al., 1973).

Более детального анализа требует вопрос о наличии антител в сыворотке или в пораженных почках к р-30 (как gs-1, так и gs-3 детерминантам). Отсутствие антител к р-30 у мышей может быть связано с толерантностью к нему или с громадным избытком этого антигена у мышей, что приводит при иммунизации к образованию в сыворотке растворимых комплексов антиген-антитело, связывающих сывороточные антитела и депонирующихся в почках.

Обнаружение антител к антигенам MuLV еще не снимает вопрос о возможной толерантности мышей к вирусным или вирусиндуцированным антигенам. Отсутствие толерантности может выявляться только на уровне В-клеток, но Т-клетки могут быть толерантны. Данные такого рода, правда предварительные, опубликованы (Chiesco-Bianchi et al., 1974).

Совершенно новый аспект проблемы выявился при изучении иммунного ответа мышей на ксенотропные эндогенные вирусы. Ааронсон и Стефенсон (Aaronson, Stephenson, 1974) показали, что взрослые мыши линий BALB, АКР, С58 (высоколейкозная линия), NZB, СЗН, А, С57BL, но не NIH содержали в сыворотке в высоком титре нейтрализующие антитела к ксенотропному вирусу мышей — BALB-v-2. F<sub>1</sub> гибриды (BALB×NIH или NZB×NIH) также содержали нейтрализующие антитела к BALB-v-2. Однако сыворотка ни одной из этих линий мышей не содержала нейтрализующих антител к BALB-v-1. Гетерологичные сыворотки, полученные как против BALB-v-1, так и против BALB-v-2, подтвердили антигенные различия обоих вирусов.

Мышиные клетки, по крайней мере по тем данным, которые опубликованы к настоящему времени, полностью непермиссивны для ксенотропных вирусов, и в то же время у мышей выявляется сильная гуморальная иммунная реакция на эти вирусы. Одно из возможных объяснений этому — нормальные клетки постоянно синтезируют какой-то антиген, который идентичен одному из антигенов мембраны ксенотропного вируса, и, если проводить аналогию с chf клеток кур, такой антиген, локализованный на по-

верхности клетки, является фактором, обуславливающим их перmissивность. Почему мыши линии NIH, содержащие в своем геноме ксенотропный вирус, иммунологически ареактивны к нему, пока установить не удалось.

Возможность спонтанного или индуцированного гуморального ответа на мембранные антигены (нейтрализующие антитела?) эндогенных вирусов дает основания для попыток вакцинации или иммунизации мышей к «спонтанному» или природному онкогенезу.

Первые положительные опыты в этом направлении уже опубликованы. Так, Хюбнер и его сотрудники получили сильные нейтрализующие сыворотки при иммунизации мышей их собственными эндогенными вирусами, обработанными формалином. Обработка мышей такой вакциной также вела к снижению частоты индукции опухолей химическими канцерогенами. Эффективной в данном случае была вакцинация мышей только «собственным» эндогенным вирусом. Эти данные носят предварительный характер; подтверждение и расширение их будет иметь принципиальное значение не только для предотвращения «спонтанного» и индуцированного канцерогенеза, но и для понимания роли эндогенных вирусов в онкогенезе (см. Huebner, 1973).

Прямой анализ иммунных факторов при «спонтанном» или индуцированном лейкомогенезе выявил значительную разницу в роли этих факторов у мышей разных линий. Так, у мышей линии C57BL при индукции лимфом облучением транзиторное подавление иммунной реакции клеточного типа, по-видимому, имеет важное значение в лейкомогенезе.

Индукция лимфом подавляется введением облученным мышам сингенного костного мозга или клеток селезенки. Механизм этого феномена неясен: реставрация иммунной системы облученных животных, факторы, способствующие регенерации тимуса, — все это, по-видимому, играет роль в ингибирующем действии сингенных лимфоидных клеток на лейкомогенез (Kaplan, 1967; Chen, 1971).

Роль иммунных факторов в патогенезе «спонтанного» лимфолейкоза мышей высоколейкозной линии AKR минимальна. Все попытки подавить развитие «спонтанного» лимфолейкоза иммунизацией мышей AKR различными препаратами вируса или сингенных опухолевых клеток были неудачны. В то же время, если мышей линии C57BL (несущих интегрированный геном RadLV) проиммунизировать RadLV, то и сыворотка и лимфоидные клетки иммунных мышей соответственно нейтрализуют вирус или подавляют рост лейкемических клеток (Pasternak, 1968; Peled, Haran-Ghera, 1974). В каком-то отношении мыши линий AKR и C57BL представляют собой крайние точки системы мышь — эндогенный вирус при «спонтанном» лимфолейкозе, однако облучение

ускоряло развитие «спонтанных» лимфолейкозов и у АКР, возможно, за счет повышения «урожая» вируса.

Мыши обеих линий несут вирусы MuLV типа Gross, тропные к собственным клеткам и передаваемые вертикально. Исходная онкогенность обоих вирусов — активируемого облучением — RadLV и спонтанно — АКР, по-видимому, идентична и крайне низка. У мышей линии C57BL иммунореактивность главным образом клеточного типа, возможно, один из самых существенных факторов контроля экспрессии эндогенной лейкозной инфекции. Между этими двумя крайними формами контроля лимфолейкоза иммунной реакцией есть и свои промежуточные формы. Гомозиготные мыши линии HRS/I несут два аллеля гена *hr* (*hr/hr*) — безволосости. У 70% таких мышей, начиная с 8-месячного возраста, возникают лимфоидные лейкемии или миелоидные лейкемии (начиная с 18-месячного возраста). Гетерозиготные по *hr* (*hr/+*)-локусу (с нормальным волосатым покровом) имеют «уровень» спонтанных лейкозов около 20%. Обработка как гомозиготных, так и гетерозиготных по *hr*-локусу мышей иммунодепрессантами приводит к 90%-ной частоте лейкемий у мышей обеих сублиний. При этом нужно отметить, что как *in vivo*, так и *in vitro* в тканях эмбрионов взрослых животных этой линии как *hr/hr*, так и *hr/+* и *+/+* обнаруживается одинаковое количество *gs-1*MuLV и спонтанно продуцируемого MuLV-Gross.

Мыши генотипа *hr/hr* характеризуются выраженной атрофией тимуса (начиная с 6-месячного возраста) и иммунологическими дефектами главным образом тимусозависимого типа. Эти данные в сочетании с результатами действия иммунодепрессанта на частоту спонтанного лейкоза у гомо- и гетерозиготных мышей позволяют думать, что первичный эффект мутантного гена *hr* на «спонтанный» лейкомогенез мышей этой линии связан со снижением эффективности иммунного надзора за опухолевыми клетками (Heiniger et al., 1974).

Характерен в этом отношении пример мышей линии NZB: несмотря на постоянную продукцию громадного количества вирусных частиц, возможно даже двух типов (MuLV-G и S-тропный вирус), генерализованные аутоиммунные поражения — Кумбс-положительную гемолитическую анемию, генерализованную лимфопролиферацию, гломерулонефрит — злокачественные лимфомы развиваются лишь у 20% животных. Однако обработка мышей NZB иммунодепрессантами или облучение резко увеличивали частоту «спонтанных» лимфом (60% и выше) (Russel et al., 1970).

Таким образом, данные, полученные при изучении иммунореактивности мышей к эндогенным вирусам С-типа (данные в значительной степени отрывочные и неполные) позволяют тем не менее сделать некоторые выводы. Очевидно, что мыши не толе-



рантны по крайней мере к некоторым антигенам эндогенных вирусов С-типа. Не исключено, что иммунореактивность является одним из «уровней» контроля экспрессии эндогенной вирусной инфекции; при этом у разных линий мышей эти уровни контроля или могут быть различными, или разные типы иммунореактивности могут выявляться.

Вопрос о патогенности эндогенных вирусов — один из самых принципиальных в проблеме. Выше мы писали, что патогенных (онкогенных) свойств у эндогенных вирусов птиц обнаружить не удалось. Точно так же сейчас отсутствуют какие-либо данные о патогенности или онкогенности ксенотропных вирусов мышей. Более того, с легкостью индуцируемый в нормальных мышинных клетках, этот тип вирусов часто не удается обнаружить в опухолевых или трансформированных клетках разных линий мышей (см. Lieber et al., 1974). Иная ситуация в случае N- или В-тропных вирусов мышей. У мышей высоколейкозных линий типа С58, АКР этиологическим агентом «спонтанной» лейкемии является «природный» эндогенный вирус данной линии. Интересно, что во всех этих системах тип клеток (определяемый Fv-1-локусом) перmissive для лейкомогенного эндогенного вируса. Сравнительно недавно Стефенсон и др. (Stephenson et al., 1974) в прямом опыте показали, что N-тропный вирус, индуцированный IudR в безвирусных культурах клеток мышей линии С58, вызывает у мышей линии NIH лимфолейкоз. Гринбергер и др. (Greenberger et al., 1975) сравнили патогенность вируса, индуцированного в клетках С58, с вирусом BALB-v-1 (N-тропный вирус из клеток 3Т3 BALB). При введении концентратов обоих вирусов новорожденным мышам линии NIH лимфобластидные лейкемии возникали у мышей, инфицированных только вирусом из клеток высоколейкозной линии. У мышей, инфицированных BALB-v-1, была обнаружена миелоидная метаплазия, которую не удавалось пассировать клетками. Весьма существенным на наш взгляд было то, что вирус из клеток мышей линии С58 был примерно в 10 раз более инфекционным *in vitro* для клеток NIH, чем BALB-v-1.

Надо подчеркнуть, что вопрос о патогенности (онкогенности) эндогенных вирусов, активированных в клетках низкораковых или низколейкозных линий, остается открытым. Выделение лейкозогенных вирусов из лимфом, индуцированных у мышей низколейкозных линий облучением или химическими канцерогенами, не исключает при этом мутацию генов эндогенного вируса. Существенно, что вирус, выделенный непосредственно из таких первичных лимфом, как правило, слабопатогенен.

*Вирусы В-типа*

Исследования, проведенные группой Бентвельзена (см. Bentvelzen, 1972), показали, что у мышей «классических» низкоракowych линий типа C57BL или O2O можно индуцировать опухоли молочных желез гормонами, химическими канцерогенами или X-лучами или совместным действием перечисленных факторов. Во всех таких опухолях были обнаружены те или иные маркеры MTV. Эти данные совпадают со «старыми» хорошо известными работами по индукции у мышей низкоракowych линий гормонами и канцерогенами опухолей молочных желез. В таких опухолях, так же как и в «спонтанных» опухолях молочных желез низкоракowych линий, находили частицы В-типа. По-видимому, все линии лабораторных мышей, а также дикие мыши содержат в молоке, в ткани нормальной молочной железы и в опухолях молочных желез, «спонтанных» или индуцированных канцерогенами, антигены MTV, а часто и характерные частицы В-типа (Bentvelzen, 1972). Так, Паркс и др. (Parks et al., 1974b) показали, что gp-52 MTV содержится в молоке мышей низкораковой линии BALB. Антигены MTV (типа gp-52) были обнаружены в лимфоидных клетках селезенки и периферической крови мышей высокоракowych линий (см. Bentvelzen, 1972). В недавнем сообщении Жиллета и др. (Gillette et al., 1974) MTV-ассоциированный антиген (по-видимому, один из структурных компонентов частиц В-типа) был обнаружен на поверхности лимфоидных клеток селезенки, лимфоузлов и перитонеальных клеток взрослых мышей всех исследованных низко- и высокоракowych линий. Антиген обнаруживался главным образом на поверхности В-типа лимфоидных клеток, и количество его коррелировало с онкологическим статусом линии. Описана «спонтанная» активация синтеза антигенов (усиление синтеза?) MTV у старых мышей низкоракowych линий (см. Bentvelzen, 1972). Следовательно, «биологические» данные об индукции вирусных опухолей молочных желез химическими и физическими канцерогенами у мышей низкоракowych линий подкрепляются иммунологическими данными об «убиквитарности» MTV у интактных мышей. Отметим также, что в более ранних работах группы Бентвельзена (см. Bentvelzen, 1972) эти факты уже были описаны: в лейкоцитах периферической крови или клетках селезенки антигены MTV постоянно обнаруживались у мышей всех линий, правда, в ряде линий (например C57BL) только у мышей старше двух лет.

Вармус и др. (Varmus et al., 1972) впервые прямо показали, что в ДНК клеток мышей как низко-, так и высокоракowych (по опухолям молочных желез) линий содержатся множественные копии генома MTV; комплементарные к MTV последовательности нуклеотидов обнаруживались как в ДНК клеток молочных желез,

так и клеток печени. При этом в ДНК вируспродуцирующей ткани не обнаруживалось амплификации вирусспецифических последовательностей. В следующей работе Вармус и др. (Varmus et al., 1973) проанализировали транскрипцию этих генов и показали, что: 1) в клетках печени и селезенки мышей как высоко-, так и низкоракковых линий синтезируется небольшое количество вирусспецифической РНК (примерно 0,1—1 экв. полного генома на 1 клетку); 2) в клетках лактирующих молочных желез мышей низкоракковых линий количество вирусспецифической РНК составляет в зависимости от линии от 1 до 200 геномов на клетку; 3) в лактирующих молочных железах и в опухолях мышей высокоракковых линий количество вирусспецифической РНК хотя и варьировало, но было в 10—100 раз больше (около 30—1000 геномов на клетку). В то же время «безвирусные» опухоли молочных желез низкоракковых линий содержали всего около двух геномных эквивалентов вируса на клетку. Увеличение количества вирусспецифической РНК в лактирующих молочных железах мышей низкоракковых линий позволяет предположить, что процесс клеточной дифференцировки и (или) гормональная стимуляция могут играть регулируемую роль в экспрессии вирусной информации в этой системе. При этом выявлялись четкие различия в количестве вирусспецифической РНК в таких клетках в зависимости от линии мышей.

Не удалось обнаружить вирусспецифических последовательностей в ДНК или вирусспецифической РНК MTV в тканях крыс, хомячков или диких полевок. Кроме того, косвенные данные дают основание предполагать, что вирусспецифическая РНК в «безвирусных» тканях молочных желез низкоракковых линий транскрибируется с участков, имеющих небольшие различия в последовательности оснований при сравнении с последовательностями оснований клеточной ДНК мышей высокоракковых линий (штаммовые отличия MTV?).

В главе III мы приводили многочисленные генетические доказательства интеграции генома некоторых штаммов MTV в геном половых клеток и передачи генома MTV самцами.

Весьма существенным для понимания роли эндогенных вирусов является по нашему мнению то, что при суперинфекции мышей разных линий самыми разными штаммами MTV никогда не удавалось наблюдать замену в геноме половых клеток собственного герминально передаваемого генома MTV суперинфицирующим. Более того, генетические исследования группы Бентвельзена (см. Bentvelzen, 1972) показывают существование очень «плотного» индивидуального клеточного контроля над экспрессией разных генов интегрированного MTV. Так, вертикальная генетическая передача интегрированного генома MTV имеет место только у «природной» линии. Присутствие генома C57BL или

других низкоракковых линий у  $F_1$  гибридов подавляет продукцию инфекционного MTV-L геномом СЗНf. В то же время геном С57BL не оказывал влияния на продукцию инфекционного вируса MTV-P в линии GR. Бентвельзен (Bentvelzen, 1972) допускает, что в геноме линии GR произошла мутация соответствующего гена-оператора.

Геном мышей линии BALB в любых скрещиваниях не оказывает ингибирующего действия на продукцию различных штаммов MTV; в то же время мыши линии BALB характеризуются очень высокой чувствительностью к индукции опухолей любыми штаммами MTV. От мышей линии BALB, которые вообще считались «свободными» от MTV, удалось выделить высоковирулентный штамм MTV-O, правда, только из опухолей старых (Old) мышей. Этот вирус передавался в линии BALB только вертикально половыми клетками. Заражение мышей линии BALB другими штаммами MTV приводило всегда к «молочному» пути передачи экзогенного MTV; никогда не отмечалась замена герминального вируса MTV-O суперинфицирующим. У мышей линии BALB химическими канцерогенами легко можно индуцировать опухоли молочных желез, однако продукция В-типа частиц в таких опухолях, как правило, не обнаруживается (репрессия продукции только собственного штамма MTV?). Интересно, что и геном высокочувствительных к MTV-S мышей линии СЗН не способен «индуцировать» MTV-O в гибридном геноме; такие мыши продуцировали только MTV-L. Все эти данные можно объяснить лишь тем, что для интегрированного генома MTV существует очень строгий и специфический клеточный механизм регуляции экспрессии его генов.

Таким образом, биологические и молекулярно-биохимические исследования показали, что онкорнавирусы В-типа широко распространены в популяции мышей, практически убиквитарны, передаются в интегрированной форме половыми клетками самцов и самок; различные канцерогенные факторы активируют экспрессию вирусного генома, который находится под контролем клеточных генов. Возможно также, что разные линии мышей могут нести отличающиеся один от другого по крайней мере по патогенности интегрированные штаммы MTV. Все это позволило Бентвельзену (Bentvelzen, 1972) и Бентвельзену и Даамсу (Bentvelzen, Daams, 1969) очень четко сформулировать гипотезу о вертикальной генетической передаче генома MTV в форме интегрированного ДНК-провируса (см. Bentvelzen, 1972).

Бентвельзен и Даамс (Bentvelzen, Daams, 1969) постулировали существование специфического репрессора провируса MTV, интегрированного в геном половой клетки (герминальный провирус). При этом предполагается определенное место интеграции герминального провируса в геноме половой клетки.



Если при действии каких-либо факторов (канцерогены, облучение) произойдет активация продукции эндогенного вируса и в результате этой активации на матрице вирусной РНК образуется вирусспецифическая ДНК, то не исключена, по мнению авторов, возможность интеграции этой ДНК уже в иное (чем для герминального провируса) место клеточного генома и, как следствие этого, образование соматического провируса MTV. В этом случае репрессор уже не будет подавлять транскрипцию и трансляцию этого соматического провируса. Совсем не обязательна, по мнению авторов, и полная идентичность герминального и соматического провируса, возможны и различия обоих провирусов в пунктуации процесса транскрипции.

\* \* \*

Имеют ли эндогенные вирусы мышей отношение к канцерогенезу в природных условиях?

Вообще этиология «спонтанного» канцерогенеза мышей *Mus musculus* изучена очень мало. Патогенный MTV был обнаружен в молоке диких мышей Эндервонтом и Дани (Andervont, Dunn, 1956) и подтвержден Ронгей и др. (Ronhey et al., 1973). Гарднер и др. (Gardner et al., 1973) при вскрытии около 300 диких мышей нашли опухоли у 9,5%, главным образом, у животных старше двух лет (в основном это были лимфосаркомы и аденомы легких). Практически в 100% лимфом выявлялся в РСК gs-1 MuLV и вирионы С-типа. У животных без опухолей gs-1 MuLV находили только у старых мышей, но также у большого количества животных (50%); в ряде случаев, но со значительно меньшей частотой, у таких животных обнаруживались и С-тип частицы. Интересен и тот факт, что в почках у старых диких мышей выявлялась характерная картина гломерулонефрита, очень напоминающая поражения почек у мышей NZB и C57BL, обусловленные комплексами антител с антигенами MuLV. В опухолях диких мышей, индуцированных химическими канцерогенами, gs-1 MuLV и вирусные частицы регулярно обнаруживались (Gardner et al., 1971a).

В цитированной выше работе Эндервонта и Дани количество спонтанных опухолей у диких мышей было значительно выше (43,5%), чем по данным Гарднера и др., хотя спектр опухолей был в основном идентичным. Наблюдались у диких мышей и опухоли молочных желез (см. Andervont, Dunn, 1956). Гарднер и др. указывают, что высокая частота опухолей могла быть связана с условиями размножения мышей, с которыми работали Эндервонт и Дани. Эти мыши содержались около 10 лет в Рокфеллеровском институте, где в изолированной популяции прошли около 10 поколений.

Недавно Гарднер и др. (Gardner et al., 1973a, b) описали необычно высокий фон спонтанных опухолей (лимфом и опухолей молочных желез) у диких мышей, отловленных в одном из районов Южной Калифорнии. В селезенках и прелактирующих молочных железах здоровых мышей этого района примерно в 80% обнаруживался в РСК gs-1 MuLV; очень часто у таких мышей были и С-тип вирионы. Опухоли у мышей этой группы возникали очень рано, начиная с 3—4 месяца; к 12 месяцу частота опухолей у них в 10—100 раз превышала «нормальный» фон. Интересно, что у этих мышей отмечено большое число случаев своеобразного прогрессирующего заболевания центральной нервной системы, вызванного онкорнавирусом С-типа. Вирусологические исследования Ронгей и др. (Ronhey et al., 1973), проведенные на диких мышах этой необычной популяции «высокого риска» опухолевых заболеваний, показали, что у этих мышей вирионы С-типа, в отличие от других групп диких мышей, были найдены в молоке; в молоке этих мышей были обнаружены также и В-тип частицы. Может быть высокий фон опухолей у мышей этого района (главным образом, лимфом) связан с возможной «горизонтальной» передачей патогенного вируса? Не является ли это следствием «патогенной» мутации нормального эндогенного вируса? Очевидно, что анализ подобных систем позволит решить, действительно ли эндогенные вирусы играют этиологическую роль в природном канцерогенезе. Недавние опыты Эндрюса и др. (Andrews et al., 1974) показали, что онкорнавирус, выделенный из спонтанных лимфом диких мышей, вызывал у мышей линии NIH и у диких мышей прогрессирующее заболевание нервной системы и злокачественные лимфомы.

Геном онкорнавирусов С-типа мышей обнаружен в клеточной ДНК нескольких подвидов диких мышей, отловленных в разных частях Света, включая *M. musculus* (Северная Америка), *M. musculus castaneus* (Восточная Азия) и *M. musculus molossinus* (Япония) (Callahan et al., 1974). Из ткани селезенки и почки *M. musculus molossinus* кокультивированием с перmissive клетками были выделены N-тропный и ксенотропный вирусы. Сам донор ткани принадлежал к N-типу мышей (Lieber et al., 1975). Ксенотропный вирус выделен этими авторами и из ткани *M. musculus castaneus*.

#### *Вирусы А-типа*

Внутрицистернальные частицы А-типа электронномикроскопически были обнаружены в клетках многих первичных и трансплантируемых опухолей, в различных перевиваемых культурах нормальных и опухолевых клеток (Wivel, Smith, 1971). Они регулярно обнаруживаются в нормальных тканях и органах взрос-

лых и новорожденных мышей и в клетках эмбриона на самых разных стадиях его развития — от стадии одно- и двухклеточного яйца до образования стадии яйцевого цилиндра. Частицы А-типа были при этом обнаружены в зародышах как низко-, так и высоколейкозных линий. Интересно, что бластоциты и яйцевые цилиндры мышей высоколейкозных линий содержали и С-тип частицы.

В неоплодотворенных яйцеклетках частицы А-типа обнаружить не удалось ни в одной из линий мышей; в то же время в партеногенетически стимулированных яйцеклетках частицы А-типа были найдены. Наибольшее количество частиц А-типа находили в 2—4-клеточном зародыше; авторы связывают появление частиц А-типа с клеточным делением после оплодотворения (см. Calarco, Szollosi, 1973; Biczysko et al., 1973, 1974; Chase, Piko, 1973).

Чейз и Пико (Chase, Piko, 1973) описали разные частицы А-типа в развивающемся мышинном эмбрионе (от оплодотворенной яйцеклетки до бластоцита). Частота и появление их зависели от стадии эмбрионального развития.

Внутрицистернальные частицы, выделенные из различных плазмоклеточных опухолей мышей и культуры ткани мышинной нейробластомы, содержали один антигенно идентичный основной структурный белок (молекулярный вес 70 000 дальтон); этот белок был антигенно отличен от группоспецифических антигенов MTV, gs-1 и gs-3 антигенов вирусов лейкозов мышей (Kuff et al., 1972).

Плавучая плотность частиц А-типа, выделенных из плазмоклеточных опухолей мышей, в сахарозном градиенте была 1,22 г/мл. Они содержали обратную транскриптазу, по своим физико-химическим и серологическим свойствам отличную от фермента С-типа онкорнавирусов мышей (Wilson, Kuff, 1972). Эти частицы содержали 60—70S РНК, однако, они резко отличались от известных онкорнавирусов отсутствием инфекционности, структурой и свойствами наружной вирусной мембраны (Yang, Wivel, 1973; Wivel et al., 1973).

Минна и др. (Minna et al., 1974) проанализировали в РСК наличие специфического антигена частиц А-типа в клетках различных клонов нейробластом мышей и крыс, фибробластов мышей и межвидовых гибридов этих клеток. Антиген найден только в клетках нейробластом мышей и в малом количестве в клетках L. Экспрессия антигена частиц А-типа в гибридных клетках проявлялась по доминантному типу.

Иотсуянаги и Эфрусси (Yotsujanagi, Ephrussi, 1974) изучали продукцию А-, С- и R-типов вирионов гибридными клетками (меланома хомячка × мышинные фибробласты). Они показали, что потеря способности продуцировать А- и С-тип вирионов не была взаимосвязанной. Не исключено, что гены, ответственные за продук-

цию разных типов онкорнавирусов, локализованы в разных хромосомах. Интересно, что в этой работе отмечена возможность образования гибридных вирусных частиц между R- и A-типом варионосов.

Создается такое впечатление, что внутрицистернальные частицы А-типа являются отдельным, *sui generis* типом эндогенных онкорнавирусов, имеющих широкое (убиквитарное) распространение не только у мышей, но и у крыс, кроликов, морских свинок, овец и человека (см. Minna et al., 1974).

#### ЭНДОГЕННЫЕ ВИРУСЫ КРЫС, ХОМЯЧКОВ, МОРСКИХ СВИНОК И СВИНЕЙ

##### *Вирусы крыс*

Характерные вирусные частицы С-типа обнаружены в клетках различных опухолей крыс, индуцированных химическими канцерогенами, в спонтанно трансформированных клетках, в спонтанных опухолях, в клетках, трансформированных онкогенными вирусами или химическими канцерогенами, в клетках культуры нормального тимуса и других перевиваемых культурах нормальных крысиных клеток. Все эти изоляты крысиных вирусов содержат общий группоспецифический антиген типа gs-1 и межвидовую антигенную детерминанту типа gs-3 (см. Ting, 1968; Aaronson, 1971a; Oroszlan et al., 1972a; Klement et al., 1972; Lieber et al., 1973; Schwartz et al., 1974).

Опухоли крыс самого разного происхождения в значительном количестве содержат gs-1-антиген (см. Hino et al., 1974) эндогенного вируса крыс (RaLV — Rat Leukemia Virus).

Вервоэрд и Сарма (Verwoerd, Sarma, 1973) показали возможность индукции BudR или IudR эндогенного вируса в эмбриональных клетках различных инбредных линий и диких крыс. Выделенный вирус имел характерный gs-1-антиген и содержал обратную транскриптазу (антигенно сходную с ферментом MuLV), но был неонкогенен и неинфекционен как для гомологичных, так и для гетерологичных клеточных культур различного происхождения (человек, обезьяна, корова, кошка, морская свинка, хомяк, мышь, всего 10 видов животных). Такие же данные об отсутствии инфекционности эндогенных вирусов крыс были опубликованы и Лейбер и др. (Lieber et al., 1973). Следует подчеркнуть, что индукция эндогенного вируса в крысиных эмбриональных клетках была транзиторна; вскоре после активации вирус исчезал и его не удавалось обнаружить. Лишь в клетках перевиваемых линий, да и то не во всех, отмечалась постоянная спонтанная продукция вируса (Schwartz et al., 1974). Эндогенные вирусы крыс, выделенные из разных источников, давали очень высокую



степень гомологии нуклеиновых кислот (около 70%) и крайне низкую — с нуклеиновыми кислотами различных вирусов С-типа мышей и приматов (см. Benveniste, Todaro, 1973). В ДНК нормальных клеток крыс содержатся нуклеотидные последовательности, комплементарные геному эндогенного вируса крыс. Возможно, что интегрированный вирусный геном состоит из двух компонентов: минорного (около 15% генома, примерно 10 копий на клетку) и основного (около 100 копий на клетку). Вирусспецифическая РНК в нормальных клетках также обнаружена; количество ее резко увеличивалось после обработки клеток BudR или BudR и метилхолантrenom (Tsuchida et al., 1975).

Эндогенный вирус крыс, спонтанно активированный из переливаемой линии NRK, имел два класса РНК — 35S и 30S. Вирус-продуцирующие клетки содержали оба класса РНК, в то время как в безвирусных нормальных клетках обнаруживалась только 30S РНК. Эта 30S РНК, по-видимому, может присоединяться к геному вируса мышей MSV, давая межвидовой гибрид эндогенного вируса крыс, с экзогенным вирусом мышей (Tsuchida et al., 1974; Scolnick, Parks, 1974). Вирус-непродуцирующие клетки мышей, трансформированные MSV-Ki (гибридный вирус), содержали в своем геноме участок, комплементарный 30S РНК эндогенного вируса крыс (Tsuchida et al., 1974).

Надо подчеркнуть, что эти результаты имеют принципиальное значение: они показывают наличие в геноме нормальной клетки нуклеотидных последовательностей, комплементарных геному саркомного вируса. Эти данные были подтверждены Скольником и др. (Scolnick et al., 1974). Из работы этих авторов следует также, что в геноме крысиной клетки могут быть интегрированы два типа эндогенных вирусов.

#### *Вирусы хомячков*

Эндогенный вирус(ы) золотистых хомячков (HaLV — Hamster Leukemia Virus) был изолирован из клеток хомячковых опухолей, индуцированных RSV, SV40 или PY, из хомячковых клеток, трансформированных *in vitro* химическими канцерогенами или онкогенными вирусами, из трансплантируемой лимфомы хомячков, а также из опухолей чистолинейных хомячков, индуцированных химическими канцерогенами, SV40 или PY (см. подробный список литературы у Charman et al., 1974). Все попытки изолировать эндогенный вирус из клеток нормальных эмбриональных тканей или тканей и органов здоровых хомячков оказались неудачными. HaLV вне зависимости от способа выделения имел характерный видоспецифический gs-1-антиген, межвидовой gs-3-антиген и специфический антиген наружной мембраны, а активность обратной транскриптазы его подавлялась антителами про-

тив этого фермента MuLV (Kelloff et al., 1970; Freeman et al., 1974).

Хомячковые эндогенные вирусы, выделенные из клеток, трансформированных различными штаммами MSV, характеризовались тропностью к хомячковой ткани. В геноме таких вирусов обнаруживались последовательности оснований, комплементарные MuLV или RaLV, в зависимости от «истории» штамма MSV (Okabe et al., 1974). В то же время штаммы HaLV, выделенные из хомячковых клеток, «не контактировавших» с экзогенными онкорнавирусами мышей, крыс и т. д., не размножались в хомячковой ткани и не имели нуклеотидных последовательностей, комплементарных каким-либо экзогенным или эндогенным (кроме HaLV) вирусам (Benveniste et al., 1974).

Антиген gs-1 HaLV и частицы С-типа часто обнаруживались в хомячковых опухолях различного происхождения; интересно, что gs<sup>-</sup>-опухоли при пассажах становились gs<sup>+</sup>. В разных линиях хомячков отмечалась разная степень репрессии gs-антигена в опухолевых клетках; в норме gs-1-антиген HaLV удалось обнаружить лишь в тканях эмбриона, да и то только у хомячков линии Graffi (Freeman et al., 1974). Однако, используя более чувствительный метод, Чарман и др. (Charman et al., 1974) обнаружили p-30 HaLV и в тканях эмбрионов хомячков линии LSH. Хатч и др. (Hatch et al., 1973) методом пассивной гемагглютинации обнаружили антигены HaLV и в эмбрионах неинbredных хомячков.

Обратная транскриптаза HaLV, выделенная Фриманом и др. (см. Freeman et al., 1974), имеет особенности, не обнаруженные ни у одного ранее исследованного эндогенного вируса млекопитающих. Этот фермент был лишен эндогенной полимеразной активности и структурно отличался от всех известных полимераз С-типа онкорнавирусов млекопитающих. HaLV, выделенный из клеток лимфомы Д-9, вообще не имел полимеразной активности (см. Verma et al., 1974). Аналогичные данные были получены при изучении вируса ХРО, выделенного нами из клеток хомячковой опухоли, индуцированной вирусом Рауса. Вирус не обладал полимеразной активностью, был апатогенен для кур, хомячков и мышей и не размножался в гомологичных и гетерологичных клетках *in vitro* (см. Ирлин, 1974).

В ежегодном отчете Special Cancer Virus Program — за 1974 г. приведены данные Хюбнера и др. (Huebner, Lane, Hill) о выделении HaLV из хомячковых опухолей, индуцированных вирусом папилломы крупного рогатого скота, вирусом РУ и канцерогеном. Эти препараты HaLV оказались онкогенными и вызывали висцеральные лимфомы при введении концентрированных препаратов вируса новорожденным хомячкам. Аналогичные данные были получены ранее Граффи и др. (см. Граффи, 1973). HaLV,

описанный Хюбнером и др., не размножался в хомячковых клетках. Однако HaLV, тропный к хомячковым клеткам, и, по-видимому, аналогичный вирусу, описанному Келлофом и др. (Kelloff et al., 1970), был выделен из хомячковых клеток, трансформированных MSV, и оказался также лейкомогенным для хомячков.

#### *Вирусы морских свинок*

Продукция вирусных частиц С-типа была индуцирована BudR в клетках первичных культур селезенки морских свинок с трансплантируемым лейкозом и в клетках нормальной эмбриональной ткани (Hsiung, 1972; Nayak, Murgya, 1973). При гибридизации РНК BudR-активированного вируса с ДНК нормальных клеток морских свинок было показано, что последовательности, комплементарные вирусному геному, удается обнаружить в ДНК нормальных, лейкемических или обработанных BudR клетках. При этом не было обнаружено каких-либо количественных различий в содержании комплементарных вирусному участков в ДНК различных клеток. Вирусспецифические последовательности, комплементарные 60—70% вирусного генома, были уникальны (2—3 копии на гаплоидный геном), в то время как оставшиеся 30—40% последовательностей, комплементарных вирусному геному, были повторяющимися (около 140 копий) и, по-видимому, гетерогенными (Nayak, 1974).

По-видимому, разные типы онкорнавирусов широко распространены в популяции морских свинок. Так, характерные вирусные частицы обнаружены в эмбриональных тканях и плацентах нормальных морских свинок. Главным образом это были внутрицистернальные частицы А-типа (Hsiung et al., 1974). Аналогичные частицы ранее были найдены и в тестикулярных клетках и ооцитах (Andersen, Jeppesen, 1972; Black, 1974).

В эмбриональных клетках или клетках взрослых нормальных животных, обработанных BudR, метилхолантроном или бензпиреном, обнаруживались два типа вирусных частиц: А-тип и С-тип (Hsiung et al., 1974).

Природа экстрацеллюлярных (С-тип) вирионов клеток морских свинок остается неизвестной. Выявлены значительные морфологические различия этих частиц от классических онкорнавирусов С-типа. Эти вирионы не содержат также межвидового gs-антигена. Обнаружено значительное сходство этих частиц с В-типом онкорнавирусов мышей (Rhim et al., 1973; Dahlberg et al., 1974). Данкель и др. (Dunkel et al., 1974) считают, что ранее опубликованные данные, где описаны онкорнавирусы С-типа в нормальных или опухолевых клетках морских свинок, неточны, и что во всех этих случаях обнаруживались частицы подобные В-типу онкорнавирусов.

*Вирусы свиней*

Различные перевиваемые линии клеток свиней продуцируют характерные частицы С-типа (Breese, 1970; Armstrong et al., 1971). Наиболее изучен вирус, продуцируемый клетками перевиваемой линии почек свиней (РК-15). Вирус содержал межвидовую антигенную детерминанту (gs-3) в р-30 нуклеотида, а активность обратной транскриптазы вирионов (молекулярный вес ее 70 000) подавлялась антисывороткой к обратной транскриптазе MuLV в той же степени, как и активность этого фермента С-типа вирусов крыс, кошек, хомячков и морских свинок. В то же время РНК-ДНК гибридизация показала отсутствие гомологичных последовательностей у «свиного» вируса с С-типом вирусов мышей, кошек, крыс, хомячков и обезьян. Нормальная печень свиньи содержала ДНК, гомологичную геному вируса, выделенного из клеток РК-15, но не содержала вирусспецифической РНК. Вирус клеток РК-15, несмотря на наличие обратной транскриптазы, не был инфекционен для всех изученных авторами клеточных линий животных разных видов (человек, обезьяна, кролик, кошка, корова, свинья и т. д.); не удалось обнаружить у этого вируса и способность «спасать» вирус саркомы Молони из трансформированных клеток крыс и мышей (см. Todaro et al., 1974; Lieber et al., 1973).

Альтштейн и др. (1973, 1974) обнаружили спонтанную продукцию А-, С- и В-типа онкорнавирусов перевиваемыми клетками почки эмбриона свиньи (СПЭВ) и почки поросенка (ПП). Вирус В-типа был инфекционен для клеток человека, содержал обратную транскриптазу и gs, идентичный gs-антигену М-PMV. Доминирующая часть популяции вирионов клеток СПЭВ имела морфологию С-типа онкорнавирусов и содержала обратную транскриптазу с молекулярным весом около 70 000 дальтон, зависимую от  $Mn^{2+}$ . Групповых антигенов, характерных для онкорнавирусов С-типа, в экстрактах этих клеток не было обнаружено.

## ГРУППА ВИРУСОВ RD-114/ССС

После пассирования клеток культуры рабдомиосаркомы RD человека в эмбрионах кошек *in utero* из опухолевых клеток был выделен С-тип вируса, названный вирусом RD-114.

Вирус обладал всеми характерными признаками онкорнавирусов: 70S РНК, обратной транскриптазой, р-30 в нуклеоиде, способностью «спасать» MSV из трансформированных безвирусных клеток и т. д. (McAllister et al., 1972, 1973). Типовой и групповой антиген RD-114 и его обратная транскриптаза антигенно были отличны от аналогичных компонентов патогенного вируса



кошек FeLV — этиологического агента лейкемии. Отличным от FeLV был для RD-114 и спектр перmissiveных клеток *in vitro*.

Первоначальное впечатление было таково, что выделенный вирус является если не этиологическим агентом рабдомиосаркомы, то, по крайней мере, природным вирусом человека. Однако последующий анализ показал, что вирус RD-114 является эндогенным вирусом кошек, а сами клетки RD — лишь перmissiveной системой для размножения этого вируса. Так, спустя год, практически идентичный вирус CCC был индуцирован IudR в безвирусных клональных линиях перевиваемых клеток почек кошки (линия Crandell). Антигенность этого вируса и спектр перmissiveных клеток были идентичны вирусу RD-114; вирус размножался в клетках человека и приматов, но клетки кошек были перmissiveной системой для обоих вирусов (Livingston, Todaro, 1973; Fischinger et al., 1973). Тодаро и др. (Todaro et al., 1973b), а позже Сарма и др. (Sarma et al., 1973, 1974) выделили (при обработке клеток IudR, BudR, при кокультивировании или даже спонтанно) вирусы, аналогичные (или идентичные) CCC и RD-114 из первичных диплоидных культур и клонов клеток эмбриональной ткани кошек. Выделенные вирусы хорошо размножались в клетках человека, приматов, собак и т. д., но клетки кошек являлись перmissiveной системой для этих вирусов. (Лишь одна линия кошачьих клеток оказалась перmissiveной для этих вирусов; характерно, что из клеток этой линии не удалось выделить и индуцировать эндогенные вирусы типа RD-114/CCC.)

Все эти вирусы иммунологически идентичны по видовому антигену р-30, поверхностному антигену оболочки и антигенным свойствам обратной транскриптазы, но полностью отличны от вирусов группы FeLV-FeSV (Oroszlan et al., 1972; Long et al., 1973). Антиген р-30 RD-114 содержит и межвидовые антигенные детерминанты типа gs-3 (McAllister et al., 1973). Непосредственно из экстрактов органов взрослых кошек или эмбрионов вирус типа RD-114, как правило, выделить не удавалось; исключение, по видимому, составляет тимус эмбриона (Sarma et al., 1974). Эти же авторы в прямом опыте показали, что в органах кошки, в которой первоначально пассировали клетки RD, содержался вирус, идентичный RD-114. Интересно, что от этой кошки удалось выделить и FeLV.

Несмотря на высокую частоту выделения вирусов типа RD-114/CCC из кошачьих клеток, вируснейтрализующие антитела к RD-114 не удалось обнаружить в сыворотках как здоровых кошек, так и животных с опухолями (Sarma et al., 1974).

В ДНК нормальных клеток кошек (но не человека) были обнаружены нуклеотидные последовательности, гомологичные полному геному RD-114 в количестве, примерно 10—20 копий ДНК RD-114 на диплоидный набор (Okabe et al., 1973a; Baluda, Roy-

Burman, 1973; Neiman, 1973a; Ruprecht et al., 1973; Fujinaga et al., 1973). В самых разных нормальных тканях домашних кошек (но не человека, мыши, крысы) была обнаружена вирусспецифическая РНК RD-114 (примерно 100 копий на клетку — сравни с продуцирующей вирус системой, где этот показатель составляет 1000 копий на клетку) (Okabe et al., 1973a; Quintrell et al., 1974). Однако, несмотря на столь высокий уровень считывания вирусспецифической информации в нормальных клетках синтеза каких-либо вирусных белков, в том числе р-30 RD-114, в них обнаружить, как правило, не удалось. Имеется единичное сообщение, что gs-1 RD-114 удавалось обнаружить, правда, очень редко, в ткани эмбрионов или в экстрактах опухолей старых кошек (см. Sarma et al., 1974).

Все выделенные штаммы вирусов группы RD-114/ССС давали высокую степень гомологии нуклеиновых кислот между собой и с RD-114 (около 60—100%). В то же время степень гомологии этих вирусов с вирусами группы FeLV-FeSV была крайне низкой (меньше 10%) или отсутствовала. Вирусы группы RD-114/ССС практически не гибридизировались и с различными В- и С-тип вирусами мышей, крыс, свиней и приматов (East et al., 1973c; Benveniste, Todaro, 1973; Okabe et al., 1973b). Удивительным оказалось антигенное сходство вирусов типа RD-114/ССС с эндогенными вирусами приматов при низкой степени около (10—20%) гомологии нуклеиновых кислот. Этот вопрос подробнее представлен в разделе «Эндогенные вирусы обезьян».

Таким образом, у одного вида животных — домашних кошек впервые было обнаружено одновременное существование двух разных групп RD-114/ССС и FeLV-FeSV одного морфологического типа онкорнавирусов, различающихся не только по наружному антигену, спектру чувствительных клеток, способу передачи и патогенности, но и по групповым и межгрупповым антигенам и последовательности оснований в геноме вируса.

Однако при заражении клеток *in vitro* FeLV они могут начать продуцировать оба типа вируса. Учитывая практически полную непермиссивность кошачьих клеток к вирусам группы RD-114/ССС, можно утверждать, что вертикальная передача — единственный путь передачи этих вирусов. По-видимому, кошки иммунологически толерантны к антигенам этого вируса. Патогенность вирусов группы RD-114/ССС для кошек или каких-либо других видов животных не установлена. В отличие от этого вирусы группы FeLV — FeSV передаются только горизонтально, даже в природных условиях они высокопатогенны, и не отмечена иммунологическая толерантность природного хозяина к антигенам в том числе и к gs-1-антигену этой группы вирусов.

Следовательно, вирусы типов RD-114/ССС являются эндогенными вирусами кошек: имеются гомологичные последовательно-

сти в ДНК нормальных клеток, такие клетки синтезируют определенное количество вирусспецифической РНК, вирус может быть индуцирован в нормальной клетке; он, по-видимому, не патогенен и клетки хозяина являются непермиссивной системой для размножения вирусов этого типа; иными словами, вирусы типа RD-114/ССС являются ксенотропными эндогенными вирусами кошек.

Вирусы группы RD-114/ССС имеют все признаки эндогенных вирусов, а вирусы группы FeLV—FeSV — экзогенных вирусов. Нет никаких оснований полагать, что эти две группы вирусов имеют общий источник происхождения («протовирус») или возникли одна из другой, настолько велики различия их свойств и признаков. Следовательно, один вид животного имеет два совершенно разных вида С-типа онкорнавирусов: один эндогенный, другой экзогенный: не исключено, что в геноме нормальных клеток кошек существовал когда-то и эндогенный прототип вирусов группы FeLV. Это вытекает из того, что в ДНК нормальных клеток кошек имеются последовательности, комплементарные по крайней мере части (примерно 30%) ДНК вируса FeLV (см. Quintrell et al., 1974). Подтверждением этому служит и то, что при обработке нормальных эмбриональных клеток кошек BudR в них можно индуцировать транзиторную продукцию gs-1 FeLV (но не инфекционного вируса) (Sarma et al., 1974).

Происхождение и распространение вирусов типа RD-114/ССС было исследовано при анализе клеточной ДНК 36 различных видов Felidae, принадлежащих к 6 родам. Считается, что все современные плотоядные произошли от общего предка, примерно 35 млн. лет назад. Примерно 15 млн. лет назад от генеалогического древа плотоядных отщепилась новая ветвь — Felidae. Бенвенисте и Тодаро (Benveniste, Todaro, 1974a) показали, что степень гомологии уникальных нуклеотидных последовательностей у ДНК различных видов Felidae очень высока (около 90%); в то же время не найдено значительной гомологии уникальных последовательностей клеточной ДНК домашних кошек с ДНК других видов плотоядных, млекопитающих и приматов Нового и Старого Света, включая высших приматов и человека (менее 2% гомологии). Иными словами, степень гомологии последовательностей оснований в молекуле клеточной ДНК совпадала с классическими филогенетическими схемами.

Гибридизация <sup>3</sup>H-ДНК транскрипта RD-114 с клеточной ДНК разных видов кошек показала 100%-ную гомологию его с клеточной ДНК домашних кошек и высокую (70—90%) степень гомологии с клеточной ДНК еще трех видов кошек (*F. sylvestris*, *F. margarita*, *F. chaus*).

У остальных исследованных 13 видов кошек Юго-Восточной Азии и Нового Света, а также «больших» африканских кошек (леопард, лев) в клеточной ДНК участков, комплементарных

RD-114, не обнаружено. Однако нуклеотидные последовательности, комплементарные  $^3\text{H}$ -ДНК RD-114, были найдены в клеточной ДНК приматов Старого Света рода Cercopithecinae (10—20%), а также у шимпанзе и гориллы (около 8%) (Benveniste, Todaro, 1974a). ДНК клеток человека не содержала участков, гомологичных ДНК RD-114. Это, однако, не говорит против возможности существования RD-114-кодируемой информации в клетках человека: р-30 антиген, частично идентичный р-30 RD-114, был обнаружен в опухолях человека (Sherr, Todaro, 1974).

Нам кажется важным подчеркнуть, что нуклеотидные последовательности клеточной ДНК, гомологичные RD-114, были найдены не у кошачьих вообще, а только у 4 видов одного ограниченного географического района. На основании полученных данных Бенвенисте и Тодаро (Benveniste, Todaro, 1974a) выдвинули положение, что RD-114 является вирусом приматов, который инфицировал предка домашних кошек примерно 10—15 млн. лет назад.

#### ЭНДОГЕННЫЕ ВИРУСЫ ОБЕЗЬЯН

Характерные частицы С-типа обнаружены при электронномикроскопическом исследовании ткани нормальной плаценты павианов (*Papio cynocephalus*) (Kalter et al., 1972) и резусов (*M. rhesus*) (Schidlovsky, Ahmed, 1973). Это послужило началом интенсивных и успешных поисков эндогенных вирусов в ткани плаценты приматов. Кокультивирование ткани нормальной плаценты павианов с клетками самых разных видов млекопитающих, включая обезьян и человека, позволило впервые выделить эндогенный вирус обезьян, который был назван М-7, и изучить его свойства (интересно, что наиболее чувствительной системой для размножения вируса М-7 оказались клетки перевиваемой линии тимуса собаки). В гомологичных клетках павианов вирус М-7 практически не размножался (Benveniste et al., 1974c).

Вирус М-7 имел все характерные признаки С-типа онкорнавируса: морфологию, близкую морфологии С-типа онкорнавирусов мышей и кошек, обратную транскриптазу с молекулярным весом 70 000 дальтон, 60—70S РНК, плавучую плотность 1,16 г/мл; обладал свойствами вируса-«помощника» и при «спасении» вируса MSV из трансформированных им клеток человека образовывал инфекционные псевдотипы MSV (М-7) (см. Hellman et al., 1974).

Впоследствии новые изоляты эндогенных вирусов С-типа павианов были получены не только из плаценты, но и из ткани яичек, почек и легких нормальных павианов при кокультивировании интактных клеток или клеток, обработанных IudR, с пермиссивными клетками тимуса собак или *M. rhesus*. Все эти изо-



ляты по своим свойствам были близки или идентичны вирусу М-7 (Todaro et al., 1974a).

Уже первые опыты по изучению иммунологических свойств вируса М-7 принесли неожиданный результат. И обратная транскриптаза, и gs-1-антиген (р-30) М-7 антигенно были полностью отличны от всех известных С- и В-типа онкорнавирусов, в том числе и от онкогенных обезьяньих вирусов SSV (SSAV-1) и от вируса GAL. Однако р-30 М-7 давал четкую перекрестную реакцию с антисывороткой против gs-1 RD-114 — эндогенного вируса кошек. Более того, спектр чувствительных клеток *in vitro* для вируса М-7 был очень близок таковому RD-114. Оба вируса взаимно интерферировали и давали перекрестную нейтрализацию гомологичными сыворотками, хотя и не полную. р-30 вируса М-7 содержал крайне мало межвидовых антигенных детерминант типа gs-3 антигена. Иначе говоря, между М-7 и эндогенным вирусом кошек четко выявлялось частичное группо- и типоспецифическое сходство. Антигенная общность четко выявлялась и при иммунологическом сравнении обратных транскриптаз обоих вирусов. Сходство между этими двумя типами вирусов подчеркивалось и тем, что они хорошо размножались в клетках приматов, но не в клетках кошек. Однако клетки кошек, перmissive для вируса RD-114, были неpermissive для вируса М-7 (Sherr et al., 1974c; Benveniste et al., 1974c).

При изучении вирусов М-7 и RD-114 методами молекулярной гибридизации была выявлена сравнительно небольшая (примерно 10—20%) степень гомологии нуклеиновых кислот обоих вирусов. Гомология полностью отсутствовала при сравнении нуклеиновых кислот вируса М-7 и вирусов группы SSV (SSAV) и GAL (Benveniste et al., 1974c, d).

Доказательства «эндогенности» вируса М-7 были получены при анализе методами молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот тканей и органов нормальных обезьян. ДНК, комплементарная вирусу М-7, была обнаружена в плаценте, печени, легких, яичках павианов (8—12 копий вирусной ДНК на диплоидный геном).

Частично гомологичные к ДНК М-7 последовательности оснований обнаружены в ДНК 10 видов обезьян Старого Света, у высших человекообразных обезьян (шимпанзе, гиббон) и человека. Наибольшая степень гомологии (около 80%) была найдена с ДНК клеток павианов (*Papio cynocephalus*). С клеточной ДНК павианов другого вида (*Papio hamadryas*) она составляла 60% и в уменьшающейся последовательности была обнаружена с клеточной ДНК других видов обезьян Старого Света. (*Cercopithecus* — около 40%, *Erythrocebus* и *Cercopithecus* — около 30%, *Macaca* — около 20%.) У человекообразных обезьян и человека степень гомологии клеточной ДНК с ДНК М-7 была незначительной и

составляла примерно 5% (Benveniste, Todaro, 1974b). Не было обнаружено какой-либо степени гомологии между ДНК М-7 и клеточной ДНК различных видов обезьян Нового Света.

Из тканевых ДНК неprimатов только клеточная ДНК домашней кошки содержала частично гомологичные участки ДНК вируса М-7. И наоборот, ДНК вируса RD-114 обнаруживала определенную степень гомологии (около 20%) с клеточной ДНК тканей и органов обезьян Старого Света (Benveniste et al., 1974a, b, c; Sherr et al., 1974a, c; Todaro et al., 1974b).

Бенвенисте и Тодаро (Benveniste, Todaro, 1974b) сравнили степень гомологии последовательностей оснований клеточной ДНК разных видов обезьян с ДНК М-7 и степень гомологии уникальных последовательностей оснований в клеточной ДНК у этих же видов обезьян. Авторы показали, что степень гомологии уникальных последовательностей клеточной ДНК разных видов обезьян находилась в полном соответствии с классическими палеонтологическими представлениями об эволюции и взаимосвязи разных видов приматов. В то же время степень гомологии генома М-7 с клеточной ДНК коррелировала с таксономическими взаимоотношениями исследованных видов.

Вирусспецифическая РНК М-7 выявлялась в разных органах павианов (легких, матке, селезенке, яичках, в меньшей степени — в печени), но полностью гомологичная вирусной ДНК была обнаружена только в ткани плаценты — ткани, где идет синтез полных вирусных частиц (Sherr, Todaro, 1974; Sherr et al., 1974a; Benveniste et al., 1974d). В то же время р-30 белок М-7 можно обнаружить в нормальной ткани павианов (яичках, селезенке), а также других обезьян Старого Света (1—3 нг на 1 мг ткани). Уровень трансляции и транскрипции вирусспецифической информации составлял в этих системах примерно 0,1—1% от вируспродуцирующей клетки. р-30 М-7 был обнаружен и в опухолях обезьян: количество его в опухоли яичника *M. rhesus* было примерно в 10 раз выше «нормы» (Sherr, Todaro, 1974; Sherr et al., 1974a, c).

Все эти данные четко показывают, что вирус М-7, выделенный из плаценты и органов нормальных павианов, является эндогенным вирусом павианов и, возможно, других видов обезьян Старого Света. В то же время два вируса С-типа обезьян — SSV(SSAV) и GAL, выделенные соответственно от двух разных видов обезьян Нового и Старого Света, не имели никакого антигенного сходства с вирусом М-7, не имели комплементарных участков с тканевой ДНК самых разных видов обезьян и человека, но были практически идентичны как по биологическим тестам (интерференция, нейтрализация, gs-1-антиген), так и в молекулярной гибридизации (степень гомологии около 75%) (Scolnick et al., 1974; Benveniste, Todaro, 1973). В нормальных клетках обезьян

ян разных видов не был обнаружен и р-30 SSV—GAL. При этом было показано, что при инфекции обезьян этими вирусами у инфицированных животных образуются антитела к gs-1-антигену SSV. Оба эти вируса (экзогенные вирусы обезьян) выявляли значительную степень гомологии нуклеиновых кислот с MuLV (около 20%) и нормальной тканью мышей (Benveniste et al., 1974b; Sherr et al., 1974c). Другой прототип вирусов обезьян M—PMV, по-видимому, широко распространенный у *M. rhesus*, не имел никаких «общих параметров» ни с SSV (SSAV), ни с вирусом M-7, ни с какими-либо известными вирусами В- или С-типа млекопитающих. Нуклеиновая кислота M—PMV не давала никакой достоверной гомологии с ДНК нормальных тканей обезьян различных видов или человека (Parks et al., 1973b).

Следовательно, у обезьян можно выделить сейчас по крайней мере три группы онкорнавирусов:

1. Группа эндогенных вирусов С-типа — прототип вирус M-7, сходная с эндогенными вирусами кошек RD-114/ССС, но отличная от всех других С-типов онкорнавирусов обезьян и других млекопитающих. Патогенность этих вирусов для обезьян или каких-либо других видов животных не установлена. Недавние совместные исследования советских и американских ученых показали, что вирус, близкий вирусу M-7, выделяется и из тканей павиана, больного лейкозом. Этот вирус С-типа, названный BILN, был выделен кокультивированием из различных органов (лимфоузлов, яичек, почек и селезенки) самца павиана (*Papio hamadryas*) с выраженными признаками лейкоза. Заболевание в данном случае было индуцировано кровью больной лейкозом самки павиана, инокулированной кровью больных лейкозом людей (см. Лапин, 1973; Яковлева и др., 1974). Вирус BILN размножался в гетерологичных клеточных культурах, обладал свойствами вируса «помощника», активность обратной транскриптазы его подавлялась антителами против фермента RD-114 или M-7, но не антителами против обратной транскриптазы SSV (SSAV) или MuLV. Иммунодиффузионный и радиоиммунологический анализы выявили значительное сходство р-30 BILN с р-30 M-7 и RD-114 (см. Goldberg et al., 1974).

Выделение вируса, сходного с эндогенным вирусом павианов (*P. cynocephalus*), из органов больного лейкозом павиана другого вида (*P. hamadryas*) представляет большой интерес. ДНК, гомологичная геному M-7, была обнаружена в клетках этого вида павианов (Benveniste, Todaro, 1974b), однако в данном случае вирус выделен от больного лейкозом животного. Лейкомогенный потенциал вируса BILN в настоящее время интенсивно исследуется. Существенно, что р-30 M-7 был обнаружен и в опухолях человека — лимфоме и карциноме яичника (Sherr et al., 1947a).

2. Группа экзогенных вирусов С-типа — SSV—GAL, по крайней мере один представитель которой — SSV-1 — имеет твердо доказанные онкогенные свойства. Этой группе присущи определенные «черты сходства» с группой лейкозных вирусов мышей (степень гибридизации, антигенность обратной транскриптазы, gs-3-антиген). Однако иммунологические, биологические исследования и данные молекулярной биологии показывают, что эти вирусы представляют собой отдельную, четко ограниченную от других вирусов С-типа, группу. Вирусы этой группы, по-видимому, широко распространены в популяции природного хозяина и «природные» антитела к этим вирусам обнаружены в сыворотках здоровых обезьян (Kawakami et al., 1973). Данные о возможной этиологической роли сходных с SSV вирусов при лейкозах человека представлены нами выше. Значительное сходство этих двух вирусов — SSV(SSAV) и GAL разных видов обезьян разных континентов предполагает существование общего источника. Тодаро и др. (Todaro et al., 1974b) высказали предположение, что ксенотропные вирусы мышей — исходный «прототип» вирусов этой группы.

3. Группа В-типа онкорнавирусов обезьян — прототип М-PMV. Отсутствие комплементарных вирусным участкам в ДНК обезьяньих клеток «вносит» его в состав экзогенных вирусов обезьян. Кроме того, М-PMV хорошо размножается в клетках гомологичного вида. Недавно обнаруженная способность этого вируса трансформировать *in vitro* клетки обезьян дает основание для детального изучения его онкогенных свойств. Если недавние находки вирусов этого типа в молоке и клетках человека будут подтверждены и удастся доказать, что мы не имеем в этом случае контаминацию клеток человека вирусом обезьян, то тогда можно будет говорить о новой общей группе вирусов обезьян и человека В-типа — группа D (см. Vykovsky et al., 1974).

Предварительные данные, нуждающиеся в подтверждении, об обнаружении общих последовательностей нуклеиновых кислот М-PMV и ДНК злокачественных опухолей молочных желез человека, а также об обнаружении gs-антигена М-PMV в опухолях человека требуют детального анализа и представляют основу для изучения роли М-PMV и сходных с ним вирусов в этиологии опухолей молочных желез человека (см. Крюкова, Ильин, 1974; Жданов и др., 1974; Colcher et al., 1974; Ильин и др., 1975).

В заключение отметим, что, по-видимому, вирусы типа М-7 не единственные представители С-типа онкорнавирусов в плацентах павианов (см. Dalton et al., 1974).

Надо также сказать, что вирусные частицы С-типа были обнаружены в плаценте не только павианов и *M. rhesus*, но и других видов обезьян (Haberling, Kalter, 1974) и человека (Kalter et al., 1973; Vernon et al., 1974).



Исследования вирусов плацент начались сравнительно недавно, но очевидно, что это направление исследований будет расширяться. Вирионы А- и С-типа были найдены в синцитии трофобласта не только разных видов обезьян, но и мышей, кошек, морских свинок, собак, лошадей, коров и человека. По-видимому, вирусы С-типа в плацентах человека могут быть обнаружены с высокой частотой (17 из 20 исследованных случаев); они не инфекционны и количество их резко увеличено в плацентах больных системной красной волчанкой. В то же время у таких больных радиоиммунологическим методом в тканях селезенки и плаценты выявлялись межвидовые антигенные детерминанты р-30 типа gs-3. Сходный антиген(ы), правда в меньшем количестве, найден в опухолях человека, в ткани больного идиопатической тромбопенической пурпурой, а также в тканях некоторых здоровых людей (Strand, August, 1974b).

#### ПРОБЛЕМА НОРМАЛЬНОЙ ИНТЕГРАЦИИ

Мы изложили выше экспериментальный материал, посвященный проблеме эндогенных вирусов у птиц и разных видов млекопитающих. Подводя итоги этим данным, можно с полной определенностью констатировать: в геноме нормальной клетки в интегрированной форме содержится геном (геномы) РНК-содержащих вирусов группы онкорна. Этот геном(ы) составляет интегральную часть клеточного генома, и его экспрессия находится под контролем клетки и макроорганизма. При этом часть генов эндогенных вирусов, по-видимому, функционирует в нормальной клетке постоянно. Те или иные факторы могут вызвать полную «естественную» или «искусственную» экспрессию интегрированного генома, и активированная клетка начинает продуцировать вирусные частицы.

Проблема эндогенных вирусов возникла изначально как чисто онкологическая (онковирусологическая) проблема, но уже сейчас ясно, что эта проблема переросла рамки онкологии, стала шире ее, хотя и продолжает оставаться тесно связанной с ней. По-видимому, можно сформулировать несколько общих вопросов проблемы эндогенных вирусов.

Каково происхождение эндогенных вирусов?

Каковы принципы и роль контроля генетической информации эндогенных вирусов в клетке?

Какова роль эндогенных вирусов при нормальном развитии, при патологических процессах и особенно при опухолевой трансформации клетки?

В 1969 г., когда многие факты, изложенные в этой главе, еще не были известны, Хюбнер и Тодаро (Huebner, Todaro, 1969), основываясь только на иммунологических и электронномикроскопи-

ческих данных, а также, по существу, на предварительных данных о спонтанной активации вирусов С-типа в перевиваемых культурах нормальных клеток мышей, сформулировали гипотезу вирогена или, как называют ее авторы, гипотезу вирусного онкогена: геном каждой нормальной клетки (в том числе и герминальной) содержит в интегрированной форме геном (вироген) С-типа онкорнавируса. (При этом авторы допускают, что вироген может быть включен в клеточный геном не только в виде единого «генного» блока, но и отдельные гены или группы генов вирогена могут быть локализованы в разных хромосомах клетки.) Геном вирогена может быть полностью репрессирован в нормальной клетке, и самые различные факторы (биологические, химические и физические) способны вызвать его экспрессию, причем эта экспрессия может быть дискретной: активируется не весь геном вирогена, а лишь отдельные его гены или группы генов. Ген (гены), вызывающий опухолевую трансформацию клетки, — онкоген — является составной частью вирогена. При экспрессии вирогена возможны: 1) продукция клеткой полного онкогенного инфекционного вируса С-типа; 2) только трансформация клетки без образования вирионов С-типа; 3) образование инфекционных, но неонкогенных вирионов С-типа без трансформации клетки; 4) образование только антигенов (компонентов) С-типа вирионов и т. д. Следовательно, авторы постулировали по существу два новых принципиальных положения:

1) вертикальную генетическую передачу генома вирогена (связанные с этим положения — интеграция генома эндогенного вируса в геном нормальной половой клетки, наличие вирогена в любой клетке, убиквитарность его) и

2) наличие в составе вирогена каждой нормальной клетки гена или генов, ответственных за опухолевую трансформацию ее.

Согласно гипотезе авторов, любой канцерогенный процесс, чем бы он ни был продуцирован (ДНК-содержащими вирусами, химическими канцерогенами, облучением), есть активация онкогена в составе убиквитарного вирогена С-типа вирионов. По сути своей гипотеза Хюбнера — Тодаро — эпигенетическая теория, так как все феномены, возникающие при опухолевой трансформации или индукции эндогенного вируса, она объясняет изменениями регуляторных систем. Надо подчеркнуть, что гипотеза Хюбнера — Тодаро оказала большое влияние на прогресс экспериментальной онкологии и «индуцировала» целый ряд экспериментальных подходов или, по крайней мере, их широкое применение: обнаружение генома вирусов в геноме нормальных клеток методами молекулярной биологии, индукцию в нормальных клетках различными биологическими, физическими и химическими факторами полного вируса С-типа или его компонентов и т. д. Нужно отметить также, что первоначально эта гипотеза была сформулирована

до открытия Балтимором (Baltimore, 1970), Теминым и Мизутани (Temin, Mizutani, 1970) обратной транскриптазы у вирионов онкорнавирусов, что подчеркивает оригинальность высказанной авторами концепции.

Выше мы писали, что Бентвельзен сформулировал практически идентичные гипотезе Хюбнера — Тодаро положения для конкретной модели, с которой он работал, — MTV, и представил очень убедительный материал в пользу правильности этих положений (см. Bentvelzen, 1972) раньше, чем это сделали Хюбнер и Тодаро. Однако он первоначально не считал, по-видимому, правильным до получения прямых доказательств «расширять» свою гипотезу на другие типы онкорнавирусов и в отличие от Хюбнера и Тодаро ограничился рамками экспериментальной модели.

Надо сказать также, что возможность вертикальной передачи онкогенного вируса герминальными клетками была высказана и доказана Гроссом в 50-е годы. Однако Гросс в своей концепции не вышел за рамки «классической» вирусологии, и эту точку зрения он подтверждает сам в последней статье (Gross, 1974).

В то же время гипотеза Хюбнера и Тодаро удивительно современна и созвучна расцвету молекулярной биологии. Интеграция генома вируса в геном половой клетки, и вообще принцип интеграции вирусного генома с клеточным, — краеугольный камень всех ее постулатов.

Гипотеза Хюбнера и Тодаро оказалась не только современной, но и очень конструктивной — мы видим теперь, что многие положения ее доказаны: в геноме нормальной клетки действительно имеется геном эндогенного вируса; вирусный геном интегрирован с клеточным геномом и сейчас уже делаются попытки идентифицировать место интеграции; вироген передается вертикально с половыми клетками как ген или группа генов; в клетках существует система контроля экспрессии и репрессии генов вирогена. Вироген может быть активирован полностью или частично, и факторы активации, по крайней мере некоторые, уже найдены. Отметим, что авторы гипотезы, наряду с другими исследователями, внесли весомый экспериментальный вклад в доказательство верности многих ее положений (см. Todaro, Huebner, 1972).

Один из весьма важных выводов, который можно сделать при анализе экспериментального материала, связанного с эндогенными вирусами, — интеграция генома вируса с геномом клетки, иначе — интегративный тип взаимодействия вируса и клетки, весьма широко распространенный в природе, сам по себе не ведет к какому-либо патологическому процессу и отнюдь не однозначен ее малигнизации (трансформации). Опухолевое превращение клетки не является следствием интегративного взаимодействия вируса и клетки. Примеры, подтверждающие это положение, имеются и в случае ДНК-содержащих вирусов, как онкогенных, так и не онко-

генных, но в случае эндогенных онкорнавирусов это носит характер закономерности.

Два вопроса, как нам кажется, требуют теперь выяснения или, правильнее, более четкого определения: что такое вироген и что такое онкоген в составе вирогена, и действительно ли в составе вирогена каждой нормальной клетки имеется в качестве его интегральной части свой онкоген.

Во-первых, представляется маловероятным, что способность существовать в форме вирогена со всеми вытекающими из этого положения «преимуществами» присуща только С-типу онкорнавирусов. Совершенно очевидно, что В-тип онкорнавирусов у мышей также убиквитарен и обладает всеми свойствами эндогенного вируса, как и С-тип. У нас нет прямых данных, но весьма вероятно, что частицы А-типа, по крайней мере одна их разновидность — внутрицистеральные — могут быть эндогенными вирусами и существовать в форме вирогена. Более того, сейчас уже, по-видимому, нельзя говорить и о вирогене С-типа — нужно говорить о вирогенах С-типа в нормальной клетке; так, по меньшей мере два разных типа эндогенных вирусов удается активировать из нормальной клетки мыши. А сколько еще не удалось? Изучив температуру плавления гибридов  $^3\text{H}$ -ДНК-продукта эндогенных вирусов (BALB-v-2, RD-114/CCC, PK-15, M-7, RaLV) с ДНК нормальных тканей различных млекопитающих, Бенвенисте и Тодаро (Benveniste, Todaro, 1974b) показали, что в геноме клетки содержится несколько копий вирусного генома с различными нуклеотидными последовательностями. Иначе говоря, методом молекулярной биологии также показана множественность типов вирогенов в геноме нормальной клетки.

Механизм размножения «медленных» и «пеющих» вирусов очень близок к таковому «классических» онкорнавирусов. ДНК-провирус «медленных» вирусов обнаружен, и очень может быть, что вирусы этих групп присутствуют в некоторых нормальных соматических (половых?) клетках в форме вирогена. Однако вертикальный генетический путь передачи для этих вирусов не показан, и в нормальных клетках овец не удалось обнаружить нуклеотидных последовательностей, комплементарных нуклеиновой кислоте вирусов висна или мэди (см. Temin, 1974).

Существование разных механизмов контроля для разных типов эндогенных вирусов дает основание считать, что при воздействии на клетку новыми типами индукторов мы сможем индуцировать в клетке новые, ныне неизвестные еще типы, виды, а может быть, и классы эндогенных вирусов.

Может ли ДНК-содержащий вирус существовать и передаваться в форме вирогена? По существу вопрос можно было бы считать решенным, если принимать во внимание тот факт, что эндогенный РНК-содержащий вирус интегрирован в геном клетки в



форме ДНК-провируса. Из поколения в поколение вертикально передаются ДНК-содержащие фаги в геноме лизогенных бактериальных клеток. По-видимому, в интегрированной форме в геноме нормальной соматической клетки могут находиться такие вирусы, как герпесные, SV40 (см., например, Smith et al., 1972). При этом показана их передача при делении клетки дочерним клеткам в интегрированной форме в составе хромосом. Различные факторы — облучение, повышенная температура, гибридизация клеток — будут активировать в нормальной клетке экспрессию генома этих вирусов. Убедительный пример возможности генетической передачи ДНК-содержащего вируса нормальными соматическими клетками представили Джаниш и Минц (Jaenisch, Mintz, 1974): бластоциты мышей были инъецированы в полость бластоциелы ДНК вируса SV40. Из части (около 40%) таких зародышей развились нормальные мыши. В ДНК ткани мозга, печени или почек 40% таких мышей были обнаружены интегрированные геномы вируса SV40 в количестве от 0,5 до 13 геномных эквивалентов на диплоидный набор. Однако возможна ли передача генома ДНК-содержащего вируса хромосомами половых клеток и последующая активация интегрированного генома в полную форму в соматических клетках, мы не знаем, и у нас нет никаких доказательств такой возможности, хотя она, по-видимому, не исключена и подробно обсуждалась нами ранее (Ирлин и др., 1973).

В настоящее время нет прямых данных, которые подтверждали бы и то положение гипотезы Хюбнера—Тодаро, что в составе вирогена каждой нормальной клетки имеется онкоген — ген или группа генов, ответственных за опухолевую трансформацию клетки. Большинство эндогенных вирусов, выделенных или «спасенных» из нормальных клеток, не только не онкогенны, но и не патогенны и не инфекционны. Инфекционны и онкогенны лишь эндогенные вирусы, активированные из клеток искусственно селекционированных линий мышей (высокоракковых и высоколейкозных), где отбор шел именно по этим признакам. Во всех указанных случаях это вирусы, обладающие способностью размножаться в клетках хозяина и, следовательно, способные к горизонтальной передаче от клетки к клетке. Не является ли таким образом способность к горизонтальной передаче одним из этапов или следствий превращения эндогенного непатогенного вируса в экзогенный и патогенный (онкогенный) агент? Правда, все это касается лишь MTV и лейкозных вирусов; в случае вирусов сарком экзогенные, высокопатогенные штаммы дефектны, и для размножения этих вирусов необходим вирус-«помощник». В то же время мы не знаем примеров вертикальной передачи герминальными клетками генома саркомных штаммов дефектных или недефектных вирусов. Сейчас этот вопрос подвергнут прямому экспериментальному анализу: методы молекулярной биологии позво-

ляют решать вопрос о существовании в составе нормального клеточного генома онкогена саркомного или лейкозного вируса. Эти данные приведены в разных главах книги. Подытоживая их, можно утверждать, что в геноме нормальных клеток кур и мышей, клеток кошек и обезьян нет нуклеотидных последовательностей, комплементарных трансформирующим генам соответствующих «природных» саркомных вирусов. По-видимому, аналогичная картина имеет место и в случае лейкозных вирусов: в геноме нормальной клетки присутствует лишь та часть генома лейкозного вируса, которая комплементарна РНК эндогенного (и, по всей вероятности, непатогенного) вируса. Исключение — клетки высоколейкозных линий мышей — искусственно созданная человеком модель.

Многочисленные данные лаборатории Спигельмана, полученные на клетках людей, больных лейкозом, включая однопяцевых близнецов, также показывают, что ДНК лейкозных и лимфомных клеток содержат последовательности нуклеотидов, отсутствующие в лимфоцитах и лейкоцитах нормальных людей (Baxt et al., 1973; Kufe et al., 1973; Nehlmann et al., 1974). Аналогичные данные были получены и для RD-114 и ДНК клеток спонтанных мастоцитом кошек (Ruprecht et al., 1973). ДНК лейкемических селезенок мышей, инфицированных вирусом Раушера, содержит RLV-комплементарные последовательности, отсутствующие в ДНК нормальных клеток мышей BALB и других линий, включая и АКР. Более того, даже имеющиеся гомологические участки ДНК (около 50%) нормальных клеток с RLV не полностью комплементарны (Sweet et al., 1974).

Все эти данные, по нашему мнению, позволяют утверждать, что в геноме эндогенного вируса (ов) нормальной клетки нет «готовой» информации онкогена в той форме, в которой он присутствует в геноме экзогенных или патогенных штаммов онкорнавирусов. Иными словами, по нашему мнению, «готовый» трансформирующий ген (гены) не является интегральной частью вирогена (ов) нормальной клетки и не передается половыми клетками вертикально от родителей потомству. В этом плане совершенно особняком стоит работа Цушида и др. (Tsuchida et al., 1974), которые обнаружили в геноме нормальной крысиной клетки участки, комплементарные геному саркомного вируса. Необходимо дальнейшее изучение этого вопроса, так как не исключено, что имеет место лишь сходство в последовательности оснований, а не их идентичность.

Если исключить такие искусственные системы, как высоко-раковые или высоколейкозные линии инбредных животных, то в нормальных клетках индуцируются непатогенные, неинфекционные эндогенные вирусы. В то же время из опухолей («спонтанных», индуцированных ДНК-содержащими вирусами или химиче-

скими канцерогенами) можно выделить патогенный эндогенный вирус. Обобщая весь этот материал, мы считаем возможным утверждать, что в геноме вирогена нормальной клетки нет готового онкогена. Различные биологические, физические и химические факторы, вызывающие опухолевую трансформацию клетки, вызывают, возможно, первичное изменение нуклеотидных последовательностей нуклеиновой кислоты вирогена (мутация, рекомбинация и т. д.), ведущее к формированию «онкогена». Последующая активация вирогена в этой системе даст уже «урожай» онкогенного вируса. Следовательно, в данной схеме первично не вирус индуцирует опухоль, а в опухоли первично может индуцироваться онкогенный вирус. Тогда в нормальной клетке мы должны, как правило, обнаруживать (или индуцировать) нормальный, не онкогенный эндогенный вирус, а из опухолевой клетки мы будем (можем) индуцировать онкогенный, эндогенный вирус, содержащий в качестве составной части онкоген. Иными словами, сначала *cancer induces virus* и только потом *virus induces cancer* (см. также Weiss, 1973).

В нормальной клетке эндогенный вирус(ы) находится под строгим и специфическим для каждого из них клеточным контролем. Активация эндогенного вируса в постнатальный период — экзвивизитный факт, вызванный теми или иными нарушениями клеточной регуляции (BudR, нефизиологические дозы гормона, облучение, старение, гибридизация, трансформация и т. д.). Не исключено, что онкогенная мутация вирогена или другие изменения генома вирогена, вследствие которых он приобретает онкогенный потенциал, будут приводить к той или иной степени автономности вирогена, и, как результат, — к «спонтанной» активации его. Однако более часто встречается другая картина: «первичная» мутация эндогенного вируса или клеточного контролирующего механизма приводит первично только к той или иной степени автономности вируса — именно такими свойствами характеризуются вирусы высоколейкозных линий мышей типа С58 или АКР. Это ведет к активации и репликации эндогенного вируса, и, таким образом, создается «пул» вирусных частиц, который содержит инфекционные, но, по-видимому, не онкогенные или слабоонкогенные вирионы. В этой популяции вируса при повторных циклах репликации могут возникать мутантные формы, обладающие онкогенными свойствами. Действительно, ведь вирус, выделяемый от мышей линии АКР, в первые 6 месяцев постнатальной жизни практически не онкогенен. Даже у лейкозных мышей АКР популяция вируса состоит главным образом из инфекционного, но не лейкозогенного вируса. Однако если таким вирусом индуцировать лейкоз у мышей линии СЗН, то лейкозные клетки последних будут выделять в основном лейкозогенный вирус, обладающий инфекционными свойствами.

Отношение «нормальных» эндогенных вирусов к онкогенным (эндогенным или экзогенным) и роль эндогенных вирусов в механизме опухолевой трансформации клетки при природном «спонтанном» канцерогенезе или канцерогенезе, индуцированном физическими и химическими агентами,— важнейший вопрос проблемы. Действительно, есть все основания полагать, что онкогенные онкорнавирусы произошли от нормальных интегрированных эндогенных вирусов. Мутация вирогена, ошибки локализации, рекомбинации разных участков различных вирогенов (или вирогена и нормального клеточного гена), рекомбинации инфекционного вируса с вирогеном как в гомологичной, так и в гетерологичной системе — вот, по-видимому, далеко не полный список возможностей осуществления этой «трансформации» от нормального эндогенного вируса в онкогенный агент. Доказательства тому — и данные молекулярной биологии о наличии общих комплементарных участков в геномах обоих типов вирусов, и их морфологическое, физико-химическое и антигенное сходство, и т. д. Этапы этой «трансформации» мы можем наблюдать на примере MTV. Эндогенный MTV-L или MTV-O передается герминальными клетками, практически не патогенен и убиквитарен. MTV-S — патогенный штамм — «творение рук человека», использовавшего отбор для создания патогенного вируса и высокоракковых линий мышей. Этот вирус высокопатогенен, не передается герминальными клетками и по нуклеотидному составу отличается от эндогенного MTV. MTV-S автономен по свойству репликации от клеточной регуляторной системы, и гомологичная клетка является для такого вируса перmissiveй.

Вирус рака молочных желез мышей линии GR — MTV-P, по-видимому, занимает промежуточное положение между этими двумя крайними видами MTV. Неся черты патогенного штамма, он тем не менее не приобрел полной автономности и контролируется геномом клетки GR. Штамм MTV-P во многом напоминает другой опухолевый вирус мышей — вирус AKR мышей высоколейкозных линий. Вирус AKR патогенен, может передаваться горизонтально и вертикально, гомологичная клетка является для него перmissiveй системой, но геном его интегрирован в геном половых клеток мышей линии AKR и контролируется системой клеточных генов. Патогенный вариант этого вируса — штамм Гросса А; этот вирус уже автономен от клеточного генома и при искусственной инфекции им не происходит интеграция в геном половой клетки, хотя вирус может при этом передаваться вертикально (через молоко, через плацентарный барьер и т. д., но всегда в виде инфекционных частиц). Эндогенный лейкозный вирус, активируемый у мышей линии C57BL,— другой крайний вариант этой группы вирусов. Вирус не патогенен в норме, убиквитарен вследствие генетической передачи, может быть активирован облучением.



Активация эндогенного вируса облучением или химическими канцерогенами у низкоракковых линий описана и для MTV (см. Bentvelzen, 1972).

Примерами автономных, высокопатогенных штаммов, активно размножающихся в гомологичных клетках (экотропные вирусы), но, по-видимому, произошедших из эндогенных вирусов, являются FeLV и такие вирусы мышей, как RLV, FLV, MLV.

Еще на заре онковирусологии американский патолог Мерфи высказал предположение, что опухолевые агенты, вероятно, имеют эндогенное происхождение (Murphy, 1931, цит. по Rowe, 1973). Эндогенное происхождение онкогенных вирусов и вирусов вообще многократно обсуждалось. Стоит вспомнить хотя бы броский афоризм Дарлингтона: «Вирус — это взбесившийся ген» — афоризм, как нельзя более подходящий к проблеме активации эндогенных вирусов. У нас в стране этой точки зрения последовательно придерживался И. М. Нейман (1961).

Бёрнет (Burnet, 1955) считал, что данные, касающиеся опухолеродных вирусов, говорят в пользу недавнего или относительно недавнего эндогенного их возникновения.

Механизм превращения неонкогенного онкорнавируса в онкогенный трансформирующий агент предельно «прост». Первый вирус должен приобрести трансформирующий ген, который совсем необязателен для его продуктивного цикла, и перед нами готовый онкогенный агент. На второй вопрос, что такое трансформирующий ген, ответить труднее. Некоторые предполагают, что трансформирующий ген — это участок нормального клеточного генома. Эта точка зрения также многократно обсуждалась на протяжении всей истории онковирусологии, а в последнее время вновь возрождена независимо и практически одновременно Фогтом (см. Vogt, 1973), А. Д. Альтштейном (1973) и Л. Б. Меклером. Наиболее по-видимому, законченную форму эта точка зрения приняла в теоретических работах Меклера, который постулировал, что нормальная клетка превратится в злокачественную, если на ее поверхности... появятся органо- или тканевоспецифические антигены, свойственные иным органам или тканям данного организма (Меклер, 1968, 1972а, 1974). По мнению автора, сущность опухолевой трансформации клетки вирусом состоит в том, что интегрированный геном вируса детерминирует на поверхности клетки синтез гетероорганный или гетеротканевый антигена, и этой «органотканевой антигенной мозаичности поверхности клетки необходимо и достаточно, чтобы подобная клетка вышла из-под контроля соседних клеток, реализуемого по механизму контактного торможения и... приобрела свойства, характерные для клеток злокачественных... способность: а) к непрерывному размножению, б) инвазии и деструкции соседних тканей, в) мета-

стазирования, г) морфологической и функциональной аплазии и д) прогрессии» (Меклер, 1974).

В настоящее время отсутствуют прямые экспериментальные данные, подтверждающие или опровергающие эту точку зрения о природе онкогена онкорнавирусов. Однако возможен и другой подход к решению этой проблемы.

Наличие в клетках эндогенных вирусов создает предпосылки «искусственного» получения гибридных и рекомбинантных вирусных частиц или фенотипического смешивания эндогенных вирусов как с онкогенными, так и с неонкогенными экзогенными вирусами. Сейчас это уже не предположение, а доказанный факт. При заражении  $chf^+$ -клеток кур вирусами типа ALV или даже вирусом везикулярного стоматита получают искусственные псевдотипы этих вирусов, содержащие в своей наружной мембране  $chf$ -антиген и имеющие характерный для E группы спектр чувствительных клеток (Weiss, 1973). Особенно «опасной» может оказаться искусственная гибридизация какого-либо онкогенного вируса с ксенотропным эндогенным вирусом. Спектр патогенности и онкогенности такого гибрида может оказаться неожиданным и поразительно широким. Многочисленны и хорошо известны ныне факты выделения вирусов с измененным спектром патогенности из гетерологичных клеток, трансформированных различными штаммами MSV. С одной стороны, трансформация активизирует в этих системах синтез полного эндогенного вируса, а с другой — в этом случае возникают гибридные онкогенные вирусы (псевдотипы) эндогенного вируса (ов) и MSV, обладающие трансформирующей активностью. Так, при заражении клеток крыс или хомячков вирусами сарком мышей получены гибридные вирусы, содержащие в своем геноме участки, комплементарные ДНК клеток крыс или хомячков — гибриды, патогенность которых резко изменена (Scolnik et al., 1973; Okabe et al., 1974). Есть основания предполагать, что участки, комплементарные гетерогенной ДНК, содержат последовательности оснований эндогенного вируса крыс (или хомячков). Так, Окабе и др. (Okabe et al., 1974), изучая несколько типов лейкозных и саркомных вирусов, показали, что MSV(RaLV) и MSV-Ki содержат в своем геноме два гетерологичных участка: один — комплементарный эндогенному вирусу мышей, а другой — комплементарный эндогенному вирусу крыс.

Гетерологичные участки содержали и вирусы, выделенные из опухолей хомячков, индуцированных MSV-H и MSV-Gz. РНК этих вирусов содержали участки, комплементарные эндогенным вирусам хомячков и мышей, а в первом случае еще и эндогенному вирусу крыс. Вирус, выделенный из опухоли хомячков, индуцированной канцерогеном, содержал последовательности, комплементарные только эндогенному вирусу хомячков.

По-видимому, такого рода процесс гибридизации лежит в основе факта, полученного Крюковой и др. (1968). Авторы показали, что при пассировании недефектного штамма вируса Рауса в клетках мышей удается получить варианты вируса Рауса, высокопатогенные как для кур, так и для разных видов млекопитающих (мышей, крыс, хомячков и обезьян). Не получен ли в этом случае гибридный вирус, содержащий геномы экзогенного вируса Рауса и эндогенного (ксенотропного?) вируса мышей.

В пользу такого предположения говорят также результаты, полученные при изучении недефектного штамма RSV(B77), пассированного в гетерологичных (утиных) клетках (Shoyab et al., 1975). Такой вирус приобретал ковалентно связанные с геномом RSV последовательности оснований, комплементарные ДНК утиных клеток. Не исключено, что образование гибридного вируса из неонкогенного инфекционного или вакцинного вируса с каким-то эндогенным вирусным геномом может привести в итоге к получению нового онкогенного вируса. Во всяком случае, такой механизм «рождения» онкогенного варианта не менее возможен, чем предположение о том, что онкогенный вирус это неонкогенный вирус + участок нормального клеточного генома. Справедливости ради надо сказать, что различия обоих предположений не носят принципиального характера, так как эндогенный вирус — это по существу и есть участок нормального клеточного генома.

Наличие в геноме нормальной клетки эндогенного вируса может препятствовать интеграции или даже инфицированию этой клетки сходным, но патогенным онкорнавирусом. Примеры такого рода описаны для патогенных и слабопатогенных штаммов MTV (Bentvelzen, 1972). При этом интегрированный геном эндогенного вируса блокирует интеграцию патогенного вируса именно в геном герминальных клеток, предотвращая, таким образом, возможность вертикальной генетической передачи патогенного (экзогенного? саркомного? лейкозного?) вируса и, как следствие этого, предотвращая гибель популяции от наследственной опухолевой болезни. Мыши линии СЗНf, выкормленные самками низкоракковых линий, несут в геноме половых клеток самцов и самок геном высокопатогенного штамма MTV-L. При заражении таких мышей высокопатогенными штаммами MTV-S у большинства из них появляются ранние опухоли молочных желез; патогенный штамм передается с молоком таких самок, но при этом никогда не удавалось наблюдать интеграции реинфицирующего штамма в геном половых клеток. В сходных системах при заражении мышей других низкоракковых линий вариантами MTV никогда не удавалось наблюдать замену эндогенного варианта вируса экзогенным. Абсолютно идентичные факты получены и в случае разных штаммов эндогенных и экзогенных лейкозных вирусов мышей (см. Bentvelzen, 1972; Weiss, 1973; Tooze, 1973).



В случае природных патогенных штаммов лейкозных или саркомных вирусов мышей, кошек и обезьян ни разу не наблюдалась вертикальная генетическая передача патогенного штамма — герминальные клетки были защищены от интеграции или даже инфекции этими вирусами. Механизм этой защиты неясен. Одно из возможных объяснений его — наличие строго постоянного места интеграции каждого вирогена в геноме половой клетки. И если «собственное» место «занято», то суперинфицирующий онкорнавирус уже не сможет встроиться или последовательно закрепиться в геноме клетки. Не исключено, что такой механизм «защиты» имеет место только в герминальных клетках в связи с предполагаемым Теминим (Temin, 1971) особым типом передачи информации в этих клетках (только ДНК→ДНК, но не РНК→ДНК — см. ниже).

Импантация яйцеклетки низколейкозной линии мышей в матку мыши высоколейкозной линии не изменяет онкогенного статуса родившихся мышей — они остаются низколейкозными. Конечно, целый ряд факторов (а не только интегрированный геном), генетических, иммунологических, физиологических и др., определяет онкогенный статус линии, но и роль вируса при этом достаточно велика, как это можно видеть на примере MTV.

Резистентность клеток природного хозяина к собственному эндогенному вирусу *in vitro* — факт, который отмечен практически для всех изученных систем и может быть связан именно с «иммунитетом» нормальной клетки, несущей вироген (ср. с иммунитетом лизогенной бактерии к реинфекции гомологичным фагом); клетки эмбрионов кур, содержащие доминантный ингибиторный ген I, резистентны к инфекции вирусами ALV подгруппы E. Не исключено, что ингибиторный локус связан с Gs-локусом и I-аллель может быть идентична Gs<sup>+</sup>-аллели. Gs<sup>+</sup>-клетки синтезируют поверхностный антиген (chf), идентичный антигену наружной мембраны ALV подгруппы E. Резистентность клеток в этом случае будет препятствовать распространению вируса, даже если он и будет активирован в каких-то клетках химическими, физическими и биологическими агентами; не могут ли эти данные объяснить селективное преимущество линий Gs<sup>+</sup> цыплят по сравнению с линиями gs<sup>-</sup>?

Утрата вирогена или репрессия каких-то его генов может привести к утрате нормальной клеткой резистентности к собственному эндогенному вирусу (см. стр. 287). Обратный процесс — приобретение клеткой резистентности к инфекции С-тип онкорнавирусами в результате активации генов интегрированного вируса — также не исключен (см. Chan et al., 1974; Livingston, Todaro, 1973).

Природа вирогена объясняется гипотезой Хюбнера — Тодаро очень просто — это вирус, который интегрировался в геном половой

клетки, и такой своеобразный генетический симбиоз был закреплен эволюцией. Принципиально иной подход к проблеме природы вирогена и его роли в канцерогенезе предложен Теминим (Temin, 1971) в его протовирусной гипотезе. В герминальных клетках, согласно Темину, нет генома вирогена, там имеются только определенные, протовирусные участки ДНК, которые в потенции могут стать матрицей для синтеза эндогенного вируса. При этом, в герминальных клетках идет лишь «классический» путь переноса информации: ДНК→ДНК→РНК→белок. В соматических же клетках возможен и «теминский» путь передачи информации: ДНК→РНК→ДНК, при котором новые последовательности ДНК могут образовываться в онтогенезе. Основная схема гипотезы следующая: определенный участок (протовирусный) ДНК соматической клетки А является матрицей для синтеза РНК, которая «передается» из клетки А в клетку В. В клетке В эта РНК служит матрицей, на которой обратная транскриптаза синтезирует ДНК. Эта новая ДНК интегрируется в ДНК клетки В. Если ДНК встроится в какое-то новое место в ДНК клетки В, она может послужить матрицей для синтеза собственной информационной РНК и РНК соседнего участка. Новая РНК клетки В может быть «перенесена» в клетку С и т. д. Таким образом, в этот процесс могут вовлекаться все новые и новые клетки, и это может послужить причиной генных дупликаций, образования генных тандемов и т. д. Если переноса РНК из клетки в клетку не происходит, а передача информации с РНК на ДНК будет в клетках А (или В, С...) повторяться (с или без интеграции новой ДНК в геном клетки), то будет происходить процесс, который носит название амплификации генов.

Если новая ДНК, образованная на РНК, встроится в гомологичный участок генома или в какое-то другое место генома — клетка С будет отличаться от клетки В, а та, в свою очередь, будет отличаться от клетки А. Таким образом, в клетке могут иметь место два типа переноса информации: ДНК→ДНК, которым определяется стабильность и сохранность генома, и ДНК→РНК→ДНК, которым определяется вариабельность, амплификация и дифференцировка. Темин считает, что в клетке имеется участок (и) генома, преддетерминированные для второго типа информационного процесса (протовирусы), которые и будут являться «потенциалом» для образования эндогенного вируса. В процессе нормального онтогенеза вследствие интеграции новых участков, свойствам обратной транскриптазы, наличию определенных ингибиторных систем и т. д. будет идти отбор определенных клеток, содержащих новые протовирусные ДНК и, обладающих новыми свойствами — так, по Темину, идет дифференцировка клеток.

Процесс нормальной физиологической эволюции протовирусного участка ДНК преддетерминирован, по мнению Темина, ДНК кле-



точного генома, статусом клетки и организма. Интеграция, например, ДНК протовирусного участка, определяемая какими-то полимеразами в «место» или рядом с генами, контролирующими структуру клеточной мембраны, может изменить специфичность клеточной поверхности; интеграция в «место», контролирующее клеточное деление, — изменять контроль клеточного размножения. Такой тип эволюции, согласно Темину, может привести и к постройке участка генома, необходимого для образования полного онкорнавируса. Под влиянием различных канцерогенных агентов в этой серии последовательных циклов переноса информации от РНК→ДНК→РНК могут возникать ошибки как в порядке нуклеотидных последовательностей, так и в локализации новых протовирусных участков, и как следствие таких ошибок, может образовываться информация, ведущая к злокачественной трансформации. Следовательно, по Темину, эндогенный вирус или онкоген строится в онтогенезе каждый раз *de novo*, и изменения, которые приводят к злокачественной трансформации, не являются нормальной функцией генетической системы. В норме протовирус герминальных клеток принимает участие в процессе нормальной дифференцировки соматических клеток, строя новые участки ДНК. Теория Темина — теория генетическая, ибо изменения, ведущие к образованию генома эндогенного вируса или онкогена, — это первичные изменения нормальной ДНК. Так как ДНК→РНК→ДНК путь переноса информации включает ДНК, РНК и белки (ферменты), образование вариантов (ошибок) под действием, например, мутагенов или канцерогенов, ведущее к малигнизации клетки, может происходить в любом из этих типов молекул. Для опухолевой трансформации клетки требуется только построение онкогена; синтез инфекционного РНК-содержащего онкогенного вируса при этом совершенно не обязателен. Существенно, что генетическая информация из клетки-донора в клетку-реципиент передается, по Темину, не только при непосредственном контакте клеток; подобная мысль о дистанционной передаче нормальной информации вирусоподобными РНК-содержащими частицами высказывалась еще Браше (1960).

Экспериментальным подтверждением этой мысли является обнаружение А- и С-типа онкорнавирусов на определенных этапах развития раннего эмбриона или частое обнаружение частиц С-типа именно в плаценте.

Одно из важных следствий гипотезы Темина, что разные клетки организма должны отличаться друг от друга по количеству или даже по «качеству» генетической информации. Гипотеза Темина предлагает прекрасное объяснение феномену амплификации генов, механизму генных и хромосомных редупликаций и дает очень конструктивную идею механизма клеточной дифференцировки — ключевого вопроса современной биологии. Одну из предпосы-

лок гипотезы Темина — наличие в нормальных клетках нормальной (отличной от вирусной) обратной транскриптазы — уже можно считать доказанной (клетки эмбриона кур, ооциты морского ежа). Что же касается различий в составе (качественных или количественных) ДНК разных клеток, то этот вопрос, по крайней мере сейчас, решен отрицательно.

Одно из наиболее существенных положений, вытекающих из гипотезы Темина, — необходимость нормальной функции вирогена или протовирусного участка клеточного генома. По-видимому, именно Темин впервые поставил этот вопрос и тем самым перевел проблему эндогенных вирусов из раздела «медицинских» проблем (проблемы патологии) в проблему общепрограммную (динамика развития, дифференцировка).

Убиквитарность вирогенов в геноме нормальных клеток, наличие клеточных регуляторных генов и систем, контролирующей экспрессию вирогена, наконец, «физиологическая» экспрессия вирогена или отдельных его генов на разных этапах эмбрионального и постнатального развития — все это говорит о тождественности вирогенов или близком сходстве их с «обычными» структурными (или иными) генами. Эндогенные вирусы могут кодировать синтез по крайней мере некоторых поверхностных антигенов нормальных клеток ( $G_{H1}$ , возможно, PC1, TL), специфичных для определенного клеточного типа нормальной дифференцировки, и играть роль при контактном взаимодействии клеток. Инфекция клеток онкорнавирусами может приводить к изменению чувствительности (как правило, к повышению) зараженных клеток к стимулирующим рост или регулирующим факторам организма. Так, MTV вызывает повышение чувствительности эпителиальных клеток молочной железы к маммотропным гормонам, вирусы лимфолейкоза, по-видимому, вызывают повышение чувствительности лимфоидных клеток к гормонам тимуса, вирусы типа RLV или FLV — к эритропоэтину, более того, заражение некоторыми штаммами FLV вообще может снять потребность гематопоэтической клетки-предшественника к эритропоэтину (см. Metcalf, 1971).

Не являются ли, таким образом, некоторые эндогенные вирусы ответственными за синтез специфических поверхностных клеточных рецепторов ряда гормонов? Во всяком случае, гормональные воздействия могут активировать экспрессию генов эндогенных вирусов в клетках-мишенях своего физиологического действия (MTV). Отсюда прямо вытекает, что при мутации вирогенов могут возникать нарушения дифференцировки клеток и органов при нормальном онтогенезе (например, лимфоидной или кровяной системы), нарушения рецепции гормонов и, как следствие, — эндокринные заболевания и т. д.

Присутствие генома эндогенных вирусов в геноме лимфоидных клеток, синтез ряда антигенов лимфоидных клеток, кодируе-

мых эндогенными вирусами, наличие иммунного гуморального ответа к компонентам эндогенных вирусов, возможность толерантности на уровне клеточного ответа — все это говорит о том, что взаимоотношения иммунной системы и эндогенных вирусов могут быть тесно связанными. В то же время при мутации самих вирогенов или контролирующих их генов могут возникать нарушения развития иммунной системы, в том числе аутоиммунные заболевания, и пример мышей линии NZB, по-видимому, хорошая тому иллюстрация.

Очевидна и тесная связь контроля экспрессии эндогенных вирусов с типом и стадией клеточной дифференцировки. Действительно, геномы и С- и В-типов эндогенных вирусов, например, мышей присутствуют в геноме всех клеток, однако вирусспецифическая РНК или вирусные белки синтезируются только определенными типами клеток.

Эти данные лишь раз подтверждают наличие специфического клеточного контроля над генами интегрированного эндогенного вируса и позволяют рассматривать разные вирогены как структурные (или иные) гены, участвующие в определенных этапах органной или тканевой дифференцировки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Весь изложенный в книге экспериментальный материал убедительно доказывает интеграцию генома вируса в геноме опухолевой клетки в тех системах, где опухолевая трансформация вызвана онкогенным вирусом. Интеграция вирусного генома с генетическим аппаратом клетки доказана результатами прямых опытов с использованием физико-химических, биологических и генетических методов.

Таким образом, гипотеза, которая была высказана 30 лет назад и которая интенсивно разрабатывалась в 50—60-е годы, в настоящее время стала теорией и занимает доминирующее положение во всех концепциях опухолевой трансформации клетки онкогенным вирусом.

История становления вирусно-генетической теории изложена в первой главе книги, ее предпосылки можно обнаружить в разные периоды развития вирусной теории рака, а ее разработка и современная формулировка тесно связаны с прогрессом биологии и молекулярно-биологических методов исследования последнего десятилетия.

Мы положили в основу изложения интеграционный принцип взаимодействия онкогенного вируса с генетическим аппаратом клетки, считая его основным в вирусно-генетической концепции. В первоначальной своей формулировке вирусно-генетическая теория разделяла трансформирующее и инфекционное действие вируса, подчеркивала разницу в механизме взаимодействия с клеткой инфекционных и онкогенных вирусов. Сейчас совершенно очевидно, что интеграционный принцип взаимодействия вируса с генетическим аппаратом клетки может быть использован для трактовки и объяснения целого ряда явлений при «аномальном» типе взаимодействия «обычных» инфекционных вирусов, для понимания «медленных» вирусных инфекций, проблем аутоиммунных заболеваний. Не исключено, что этот же принцип возможно применить и при определенных типах взаимодействия с клеткой не только вирусов, но и микоплазм и даже бактерий.

Именно поэтому нам хотелось представить и возможную эволюцию вирусно-генетической теории. Эту эволюцию, вероятно, сле-



дует рассматривать как распространение идеи об интеграции геномов вируса и клетки только при опухолевой трансформации до общебиологического феномена интеграции двух геномов как одного из факторов нормального развития и эволюции.

Физическая интеграция генома онкогенного вируса в геном опухолевой клетки ныне твердо доказана. Впервые убедительные факты такого рода получили Дальбекко с сотрудниками для вируса полиомы, а затем подтвердили, уточнили и расширили несколько групп исследователей для вируса SV40, аденовирусов, онкорнавирусов. Большой экспериментальный материал, посвященный этой проблеме, позволяет составить общую картину интеграции. Для перечисленных групп онкогенных вирусов вирусная или вирусспецифическая ДНК интегрирована в геном опухолевой клетки в виде двухспиральной линейной молекулы, ковалентно связанной с клеточной ДНК. По-видимому, этот процесс принципиально сходен с интеграцией генома фага в ДНК бактериальной клетки при лизогении. По крайней мере для вирусов группы Рарова и онкорнавирусов интеграционное взаимодействие вирусного генома с клеточной ДНК является частью «нормального» вегетативного цикла вирусной репликации.

Количественная и качественная стороны интеграции тесно связаны с перmissивностью или неперmissивностью клетки-мишени. В принципе возможна интеграция полной молекулы вирусной ДНК, только фрагментов этой молекулы или одновременная интеграция как целых молекул, так и ее фрагментов.

Из доказательства феномена интеграции вытекают две основные задачи последующих экспериментов: 1) существует ли вирусный ген, ответственный за интеграцию? и 2) существует ли специфическое место интеграции? Оба вопроса достаточно сложны для экспериментального разрешения, однако имеющиеся в настоящее время данные позволяют предполагать (по крайней мере для вирусов группы Рарова), что ген интеграции существует и что статус трансформированной клетки приобретает лишь после интеграции вирусного генома лишь с определенной хромосомой клетки. Специфичность места интеграции вирусной ДНК в клеточную ДНК, по-видимому, имеет первостепенное значение для поддержания трансформированного фенотипа клетки, поскольку именно место интеграции будет существенным образом влиять на спектр синтезируемых информационных РНК и соответствующих белков, в том числе и гипотетического трансформирующего фактора.

Разноречивая информация имеется в отношении вирусов группы герпеса. С одной стороны, имеются данные о наличии в трансформированных клетках полной копии вирусного генома, а с другой — об отсутствии ковалентного связывания этого генома с клеточной ДНК. В связи с этим высказывается предположение о существовании вирусной ДНК в форме эписомы.

Интеграция генома РНК-содержащих онкогенных вирусов опосредована образованием в цитоплазме на ранних стадиях инфекции кольцевой формы вирусспецифической ДНК. Эта ДНК представляет собой полную копию вирусного генома, а синтез ее осуществляется за счет обратной транскриптазы вирионов. Такая вирусспецифическая ДНК мигрирует в ядро, где и происходит интеграция ее с ДНК клетки. Многие детали этого процесса остаются и по сей день неясными. В опухолевых клетках различного происхождения при «экзогенной» инфекции трансформирующим вирусом интегрировано 1—3 генома саркомного вируса.

Очевидно, что все онкогенные вирусы несут в своем геноме две основные группы генов — ответственных за репродукцию и за злокачественную трансформацию клетки. Таким образом, современная онковирусология непосредственно подошла к решению своего, может быть, самого кардинального вопроса — выделению и локализации гена или генов, непосредственно ответственных за злокачественную конверсию клеток. Такой ген, по-видимому, идентифицирован для вируса SV40 (tsA-ген), и есть основания полагать, что продукт деятельности этого гена, представленный либо Т-антигеном, либо каким-то фактором, тесно с ним связанным, осуществляет трансформацию клеток.

Совокупность имеющихся в настоящее время экспериментальных данных свидетельствует о том, что сама по себе интеграция еще не определяет статуса трансформации. По-видимому, она является лишь способом закрепления генетической информации вируса для наследственной передачи его опухолевым клеткам. Статус трансформации определяется уровнем экспрессии интегрированного вирусного генома, т. е. синтезом вирусспецифических РНК.

В клетках, трансформированных ДНК-содержащими вирусами, имеет место синтез лишь «ранних» РНК, транскрибируемых с матрицы интегрированной вирионной ДНК. Наличие такой РНК обеспечивает синтез необходимого количества белков для поддержания трансформированного состояния клетки. Однако мы практически ничего не знаем о факторах, регулирующих экспрессию этой РНК на стадии транскрипции с ДНК, о посттранскрипционной модификации и о модификации РНК в процессе переноса из ядра в цитоплазму.

В отношении РНК-содержащих вирусов вопрос еще менее изучен, хотя имеющиеся данные позволяют предполагать, что в клетках, трансформированных онкорнавирусами, в отсутствие продукции вирионов также имеет место лишь частичная транскрипция интегрированного вирусного генома.

Таковы факты, и эти факты полностью подтвердили справедливость основного положения вирусно-генетической теории об ин-

теграции вирусного и клеточного геномов в процессе злокачественного перерождения нормальной клетки в опухолевую.

Изучение эндогенных вирусов и нормальной интеграции значительно расширило рамки вирусно-генетической концепции и придало ей характер общеприкладной биологии. Факты, полученные при изучении этой проблемы, с успехом могут быть привлечены для понимания механизмов развития и дифференцировки многоклеточных организмов, а также возможных путей и принципов эволюции целых видов. Гипотезы Хюбнера—Тодаро и Темина включают в себя вирусно-генетическую концепцию, или, вернее, интеграционное взаимодействие вирусного генома с ДНК клетки, как один из постулатов, который уже не нуждается в доказательствах.

Возникновение проблемы эндогенных вирусов представляет новую ступень в вирусно-генетической концепции. Оно доказывает, что интеграционный тип взаимодействия генома вируса с геномом клетки чрезвычайно широко распространен в природе. Возможно он является эволюционно-закрепленным новым типом «взаимовыгодного» симбиоза вируса и многоклеточного организма — генетическим симбиозом.

Геном эндогенного вируса (ов), по крайней мере часть генов его, постоянно экспрессируется, и «продукты» этих генов в настоящее время интенсивно изучаются. Предположение о наличии у эндогенных вирусов нормальной функции и (или) функций, необходимых для нормальной дифференцировки или нормальной жизнедеятельности клетки, хорошо согласуется с имеющимися фактами. Точное определение этой функции (функций) явилось бы существенным вкладом в биологию.

Из этого следует, что мутация эндогенного вируса или клеточных факторов его регуляции может оказать влияние на ход нормального развития организма. «Новоприобретенный» геном эндогенного вируса в геноме половой клетки или мутация герминального эндогенного вируса могут явиться одним из факторов эволюции. Не исключено, что геном эндогенного вируса локализуется в определенном месте клеточного генома. Такой интегрированный эндогенный вирус можно рассматривать как «обычный» структурный ген. Совершенно очевидно, что дальнейшая разработка проблемы эндогенных вирусов и нормальной интеграции окажет существенное влияние и на наше понимание происхождения и эволюции «инфекционных» вирусов и инфекционных вирусных заболеваний.

«Частным» аспектом этого вопроса является проблема, происхождения и эволюции онкогенных вирусов, по крайней мере, онкогенных РНК-содержащих вирусов. Каков конкретный механизм превращения эндогенного вируса, для которого клетка является непермиссивной системой, в патогенный экотропный агент,

мы не знаем, но уже имеющиеся модели и методы, по-видимому, позволят в недалеком будущем представить достаточно полную картину этого феномена. Совершенно очевидно, что между этими крайними формами будут обнаружены (и уже обнаружены) десятки «промежуточных» форм, отличающихся как по степени патогенности (онкогенности), так и по степени автономности («горизонтальности»).

\* \* \*

Мы ни в коей мере не претендуем на полноту изложения всех материалов по вирусологии опухолей, задача этой книги заключалась в рассмотрении только тех материалов, которые связаны с вирусо-генетической теорией происхождения опухолей.

Выражаем самую искреннюю признательность профессору Гарри Израилевичу Абелеву, чье постоянное внимание и дружеские советы оказали нам большую помощь в работе над книгой.



## ЛИТЕРАТУРА

- Агеевко А. И.* В кн. «Вирусы, рак, иммунитет». М., «Медицина», 1965, стр. 47.
- Агеевко А. И.* Вирусный канцерогенез. М., «Медицина», 1969.
- Агеевко А. И.* Молекулярная биология и иммунология вирусного канцерогенеза. М., «Медицина», 1974.
- Альгштейн А. Д.* Журн. Всес. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1973, 18, 630.
- Альгштейн А. Д., Герасина С. Ф., Захарова Л. Г., Карелин В. П., Быковский А. Ф., Жданов В. М.* Вопросы вирусологии, 1973, 2, 222.
- Альгштейн А. Д., Зайцев Б. В., Захарова Л. Г., Герасина С. Ф., Ильин К. В., Карелин В. П., Быковский А. Ф., Миллер Г. Г., Жданов В. М.* Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 85.
- Анджапаридзе О. Г., Рапопорт Р. И., Юровская Г. Б.* Вопросы вирусологии, 1970, 5, 579.
- Анджапаридзе О. Г., Степанова Л. Г., Розина Э. Э., Прянишникова Л. В.* Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 28.
- Ардашников С. Н., Спаская И. Г.* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 1949, 9, 44.
- Артамонова В. А.* Вопросы патогенеза и иммунологии опухолей. М., Медгиз, 1956, стр. 61.
- Бергольц В. М.* О вирусной этиологии лейкозов человека. М., Медгиз, 1960.
- Бергольц В. М.* Проблема лейкоза. М., «Медицина», 1973.
- Бергольц В. М., Румянцев Н. В.* Сравнительная патология и этиология лейкоза человека. М., Медгиз, 1956.
- Бердышев Г. Д.* Успехи соврем. биол., 1968, 66, 226.
- Беренблом И. Н.* В кн. «Успехи в изучении рака». М., 1956, т. 2, стр. 9.
- Бершадский А. Д., Гельфанд В. И.* Цитология, 1970, 12, 423.
- Блюмкин В. Н., Жданов В. М.* Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клеток. М., «Медицина», 1973.
- Браше Ж.* Биохимическая цитология. М., «Мир», 1960.
- Быковский А. Ф., Миллер Г. Г., Клицунова Н. В.* Вопросы вирусологии, 1973, 2, 215.
- Быковский А. Ф., Миллер Г. Г., Жданов В. М.* Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 37.
- Васильев Ю. М., Маленков А. Г.* Клеточная поверхность и реакция клетки. Л., 1968.
- Гайдамович С. Я., Жданов В. М.* Вопросы вирусологии, 1972, 3, 361.
- Гендон Ю. З.* Генетика вирусов человека и животных. М., «Наука», 1967.
- Георгиев Г. П.* Мол. биол., 1970, 4, 1.
- Гершензон С. М.* Успехи соврем. биол., 1973, 75, 3, 323.
- Голубев Д. В., Шлякевич М. А.* Современные аспекты вирусной теории происхождения злокачественных новообразований. Л., 1972.
- Граффи А.* Вопросы онкологии, 1973, 1, 56.
- Дейнхарт Ф., Дейнхарт Д.* Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 113.
- Дейчман Г. И.* Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 152.
- Дядькова А. М.* Фильтрующиеся и нефилтрующие саркомы. Л., 1966.
- Жданов В. М., Быковский А. Ф., Альгштейн А. Д.* Вопросы вирусологии, 1973, 4, 411.

- Жданов В. М., Ильин К. В., Быковский А. Ф., Альтштейн А. Д., Демидова С. А., Мазуренко Н. Н., Волкова М. Я., Березина О. Н., Ершов Ф. И. Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 13.
- Жданов В. М., Мазуренко Н. П., Яковлева Л. С. Вопросы вирусологии, 1973, 1, 45.
- Жданов В. М., Соловьев В. Д., Бектемиров Т. А. Вопросы вирусологии, 1972, 4, 419.
- Зильбер Л. А. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол., 1945, 3, 43.
- Зильбер Л. А. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол., 1945, 4—5, 16.
- Зильбер Л. А. Вирусная теория происхождения опухолей. М., 1946.
- Зильбер Л. А. Вопросы вирусологии, 1961, 1, 3.
- Зильбер Л. А. Вирусно-генетическая теория возникновения опухолей. М., «Наука», 1968.
- Зильбер Л. А., Абелев Г. И. Вирусология и иммунология рака. М., Медгиз, 1962.
- Зильбер Л. А., Артамонова В. А. Докл. АН СССР, 1954, 96, 1057.
- Зильбер Л. А., Вострухова Е. И. Журн. микробиол. и иммунобиол., 1933, вып. 11, 66.
- Зильбер Л. А., Вострухова Е. М. Журн. микробиол. и иммунобиол., 1934, вып. 12, 517.
- Зильбер Л. А., Крюкова И. Н. Вопросы вирусологии, 1957, 4, 239.
- Зильбер Л. А., Крюкова И. Н. Вопросы вирусологии, 1958, 3, 166.
- Зильбер Л. А., Шапиро В. С., Гардашьян А. М. Вопросы вирусологии, 1962, 3, 282.
- Зильбер Л. А., Шевлягин В. Я. Вопросы вирусологии, 1964, 3, 269.
- Иевлева Е. С., Энгельгардт Н. В., Абелев Г. И. Бюллетень эксперим. биол. и мед., 1969, 10, 73.
- Ильин К. В., Быковский А. Ф., Спуре Ж. Ж. Бюллетень эксперим. биол. и мед., 1972а, 2, 86.
- Ильин К. В., Быковский А. Ф., Жданов В. М. Вопросы вирусологии, 1972б, 4, 494.
- Ирлин И. С. Изучение факторов, детерминирующих *in vivo* и *in vitro* вирусный канцерогенез. Докторск. диссертация. М., 1973.
- Ирлин И. С., Быковский А. Ф., Жданов В. М. Вопросы вирусологии, 1973, 2, 230.
- Ирлин И. С., Зильбер Л. А. Вопросы вирусологии, 1962, 1, 22.
- Ирлин И. С., Ильин К. В., Быковский А. Ф., Миллер Г. Г., Волкова М. Я., Жданов В. М. Вопросы вирусологии, 1974, 2, 141.
- Ирлин И. С., Киселев Ф. Л. Итоги науки (вирусология), т. 4. М., Изд. ВИНТИ, 1972.
- Киселев Ф. Л. Успехи биол. химии, 1973, 14, 47.
- Кравченко А. Т., Альтштейн А. Д., Воронин А. С. Вопросы вирусологии, 1967, 2, 3.
- Крюкова И. Н. Вопросы вирусологии, 1961, 3, 313.
- Крюкова И. Н., Ильин К. В. Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 204.
- Крюкова И. Н., Обух И. Б., Бирюлина Т. И. Вопросы онкологии, 1968, 6, 69.
- Кукайне Р. А., Нагаева Л. И., Ложа В. П., Коньчева В. В., Чапенко С. В., Брацлавская О. И., Александрова М. А., Устилюкова Э. А. Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 92.
- Лалин Б. А., Яковлева Л. А., Инджия Л. В. Вестник АМН СССР, 1973, 4, 10.
- Лежнева О. М. Вопросы онкологии, 1961, 7, 53.
- Ловенцукый А. Н., Киселев Ф. Л., Зарецкий И. З., Быковский А. Ф., Ирлин И. С. Вопросы вирусологии, 1975, 1, 8.
- Мазуренко Н. П. Роль вирусов в этиологии лейкозов. Киев, 1962.
- Мазуренко Н. П., Мерекалова Э. М., Яковлева Л. С. Вестник АМН СССР, 1972, 10, 11.
- Маркерт К., Уришпрунг Г. Генетика развития. М., «Мир», 1973.
- Меклер Л. Б. Журн. Всес. хвм. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1968, 13, 431.
- Меклер Л. Б. Биофизика, 1969, 14, 210.
- Меклер Л. Б. В кн. «Молекулярные механизмы генетических процессов». М., 1972, стр. 141.
- Меклер Л. Б. Онтогенез, 1974б, 5, 230.
- Миллер Г. Г., Букринская А. Г., Быковский А. Ф. Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 68.

- Младенов З. Сравнительная патология лейкозов птиц. София, 1974.
- Нейман И. М. Основы теоретической онкологии. М., 1961.
- Нагаева Л. И. Вопросы вирусологии, 1966, 2, 18.
- Николау С. Успехи соврем. биол., 1955, 39, 25.
- Новинский М. А. Мед. вестник, 1876, № 25.
- Оленов Ю. М. Клеточная наследственность, дифференцировка клеток и канцерогенез как проблемы эволюционной генетики. Л., 1967.
- Оленов Ю. М. Цитология, 1962, 4, 251.
- Оловников А. М. Докл. АН СССР, 1974, 201, 6, 1496.
- Петров Н. Н. Злокачественные опухоли. М., Медгиз, 1947.
- Радзиховская Р. М. Некоторые закономерности противоопухолевого иммунитета. М., «Медицина», 1971.
- Свет-Молдавский Г. Я., Скорикова А. С. Вопросы онкологии, 1957, 3, 673.
- Соловьев В. Д., Бектемиров Т. А., Жданов В. М., Кицак В. Я., Хватова Н. В., Делимбетова Г. А., Бочаров А. Ф. Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 22.
- Соловьев В. Д., Шубладзе А. К., Бочаров А. Ф. Вестник АМН СССР, 1972, 6, 3.
- Тер-Григоров В. С. В кн. «Вирусы, рак, иммунитет». М., «Медицина», 1965б, стр. 146.
- Тимофеевский А. Д. Роль вирусов в возникновении опухолей. М., Медгиз, 1961.
- Харрис Г. Ядро и цитоплазма. М., «Мир», 1973.
- Шабад Л. М. Очерки экспериментальной онкологии. М., Медгиз, 1947.
- Шевлягин В. Я. Формы взаимодействия вируса куриной саркомы Рауса с клетками млекопитающих. Докторск. диссертация. М., 1973.
- Шевлягин В. Я., Каражас Н. В. Вестник АМН СССР, 1970, 3, 87.
- Шевлягин В. Я., Быковский А. Ф., Каражас Н. В., Черепанцева Е. А., Чижевская В. И. Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 229.
- Шлякевич М. А. Успехи соврем. биол., 1972, 73, 2, 192.
- Шлякевич М. А., Парцхалашвили Д. С., Пригожина Т. Б., Дризе О. Б., Шапог В. С. Бюллетень эксперим. биол. и мед., 1975, 1, 47.
- Яковлева Л. А., Лапин Б. А., Инджия Л. В., Воеводин А. Ф., Азрба В. З., Дьяченко А. Г., Чувилов Г. Н. Сб. «Вирусы рака и лейкоза». М., 1974, стр. 106.
- Aaronson S. A. Virology, 1971, 44, 29.
- Aaronson S. A., Anderson G. R., Dunn C. I., Robbins K. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 3941.
- Aaronson S. A., Dunn C. Y. Science, 1974, 183, 422.
- Aaronson S. A., Hartley J. W., Todaro G. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 64, 87-94.
- Aaronson S. A., Jainchill J. J., Todaro G. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971a, 68, 920.
- Aaronson S. A., Parks W. P., Scolnick E., Todaro G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971b, 68, 920.
- Aaronson S. A., Stephenson J. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 2055.
- Aaronson S. A., Stephenson J. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 1957.
- Aaronson S. A., Stephenson J. R., Greenberger J. S. J. Virol., 1974, 13, 1404.
- Aaronson S. A., Todaro G. J., Scolnick E. M. Science, 1971c, 174, 157.
- Abelev G. I. Progr. Exper. Tumour Res., 1965, 7, 105.
- Abelev G. I., Elgort D. A. Int. J. Cancer, 1970, 6, 145.
- Abrell J. W., Gallo R. C. J. Virol., 1973, 12, 431.
- Ackerman W., Barker G., Ting E. Bacteriol. Proc., 1971, 221.
- Acheson N. H., Buetti E., Scharrer K., Weil R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 2231.
- Adams A., Lindahl T., Klein G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 2888.
- Ahmed M., Korol W., Schidlovsky G. Cancer Res., 1975, 1973, 14, 34.
- Ahmed M., Mayyasi S. A., Chopra H., Shidlovsky G. J. Nat. Cancer Inst., 1971, 46, 1325.
- Albrecht T., Rapp F. Virology, 1973, 55, 53.
- Albu E., Holmes K. V. J. Virol., 1973, 12, 1164.
- Ali M., Baluda M. A. J. Virol., 1974, 13, 1005.

- Allen D. W. *Biochem. Biophys. Acta*, 1968, 154, 388.
- Allison A. C. *Transplant. Rev.*, 1974, 19, 3.
- Aloni J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 2404.
- Aloni J. *Nature New Biol.*, 1973, 243, 2.
- Aloni J., Locker H. *Virology*, 1973, 54, 495.
- Aloni J., Winocour E., Sachs L. J. *Mol. Biol.*, 1968, 31, 415.
- Aloni Y., Winocour E., Sachs L., Torten J. J. *Mol. Biol.*, 1969, 44, 333.
- Altaner C., Svec F. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1966, 37, 745.
- Altanerova V., Altaner C. *Neoplasma*, 1972, 19, 405.
- Altstein A. D., Deichman G. I., Dodonova N. N. *Virology*, 1966, 30, 747.
- Altstein A. D., Deichman G. I., Dodonova N., Sarycheva O. *Virology*, 1967b, 33, 747.
- Altstein A. D., Sarycheva O. F., Dodonova N. N. *Virology*, 1967a, 33, 744.
- Altstein A. D., Zakharova L. G., Argirova R. M., Gerassina S. F., Zhadanov V. *Neoplasma*, 1973, 20, 545.
- Andersen H. K., Jeppesen T. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1972, 49, 1403.
- Andervont H. B., Dunn T. D. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1956, 28, 1153.
- Andrewes C. H., Pereira H. G. *Viruses of Vertebrates* (Williams, Wilkins). Baltimore, 1972.
- Andrews J., Gardner M., Murray B. J. *Neuropathol. and Exptl. Neurol.*, 1974, 33, 285.
- Aoki T. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1974, 52, 1029.
- Aoki T., Old L. J., Boyse E. A. *Nat. Cancer Inst.*, 1966, 22, 449.
- Armstrong D. J. *Virol.*, 1969, 3, 133.
- Armstrong J., Edmonds M., Nakazato H., Phillips B., Vanghan H. *Science*, 1972, 176, 526.
- Armstrong J. A., Porterfield J. S., DeMadrid. *J. Gen. Virol.*, 1971, 10, 195.
- Armstrong M., Ruddle N., Lipman M., Richards F. J. *Exptl. Med.*, 1973, 137, 1163.
- Astrin S. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 2304.
- August J. T., Bolognesi D., Fleissner E., Gilden R., Nowinski R. *Virology*, 1974, 60, 595.
- Avery O., McLeod C., McCarty M. J. *Exptl. Med.*, 1944, 79, 137.
- Axel R., Gulati S. C., Spiegelman S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972b, 69, 3133.
- Axel R., Schlom J., Spiegelman S. *Nature* 1972a, 235, 32.
- Axel R., Schlom J., Spiegelman S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972c, 69, 535.
- Axelrad A. A. *Progr. Exper. Tumor Res.*, 1965, 6, 30.
- Axelrod D., Habel K., Bolton E. T. *Science*, 1964, 146, 1466.
- Azuna M., Hudson J. B., Aizawa C., Fisher H. J. *Virol.*, 1969, 3, 275.
- Babiuk L. A., Hudson J. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 42, 111.
- Bader J. P. *Virology*, 1964, 22, 462.
- Bader J. P. *Virology*, 1965, 26, 253.
- Bader J. P., Bader A. V. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, 67, 843.
- Bader J. P., Steck T. L. *J. Virol.*, 1969, 4, 454.
- Balduzzi P., Morgan H. R., *J. Virol.*, 1970, 5, 470.
- Ball J. K., McCarter J. A. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1971, 46, 751.
- Ball J. K., Harvey D., McCarter J. A. *Nature*, 1973, 241, 272.
- Baltimore D. *Nature*, 1970, 226, 1209.
- Baltimore D., Smoler D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 1507.
- Baltimore D., Smoler D. *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 7282.
- Baltimore D., Verma I., Drost S., Mason W. S. *Cancer Res.*, 1974, 34, 1395.
- Baluda M. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 576.
- Baluda M. A., Drohan W. N. *J. Virol.*, 1972, 10, 1002.
- Baluda M. A., Markham P. D. *Nature New Biol.*, 1971, 231, 90.
- Baluda M. A., Nayak D. P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, 66, 329.
- Baluda M. A., Roy-Burman P. *Nature New Biol.*, 1973, 244, 59.
- Baluda M. A., Shoyab M., Markham P., Evans R., Drohan W. *Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1974, 47.
- Barahona H., Melendez L. V., Melnick J. L. *Intervirology*, 1974, 3, 175.
- Barbanti-Brodano G., Swetly P., Koprowski H. J. *Virol.*, 1970, 6, 644.
- Barski G., Blanchard M. G., Youn



- G. K., Leon B. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1973, 51, 781.
- Bases R., Mendez F. *Biomedicine*, 1973, 19, 421.
- Basilico C., DiMayorca G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1965, 54, 125.
- Basilico C., Marin G., DiMayorca G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 56, 208.
- Basilico C., Matsuya Y., Green H. *Virology*, 1970, 41, 295.
- Basilico C., Renger H. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 69, 109.
- Basilico C., Wang R. *Nature New Biol.*, 1971, 230, 105.
- Bassin R. H., Phillips L., Kramer M. J., Fishinger P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 1520.
- Bassin R. A., Tuttle N., Fishinger P. J. *Int. J. Cancer*, 1970, 6, 95.
- Bassin R. H., Tuttle N., Fishinger P. J. *Nature*, 1971, 229, 564.
- Bastian F. O. *Lab. Invest.*, 1971, 25, 169.
- Batzing B. L., Yurconic M., Hanna M. G. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1974, 52, 117.
- Bauer H., Daams J. H., Watson K. F., Mölling K., Gelderblom H., Schäfer W. *Int. J. Cancer*, 1974, 13, 254.
- Baxt W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 2853.
- Baxt W., Hehlmann R., Spiegelmann S. *Nature New Biol.*, 1972, 240, 72.
- Baxt P. W., Yates J. W., Hehlmann R., Spiegelman S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 2629.
- Bayreuther K. E., Romig W. *R. Science*, 1964, 146, 778.
- Beard J. W., Langlois A. J., Beard D. *Bibl. Haemat.*, 1973, 39, 31.
- Beemon K., Duesberg P., Vogt P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 4254.
- Bellamy A. R., Gillies S. C., Harvey J. D. *J. Virol.*, 1974, 14, 88.
- Benjamin T. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1965, 54, 121.
- Benjamin T. L. *J. Mol. Biol.*, 1966, 16, 359.
- Benjamin T. L. *Virology*, 1968, 36, 4, 685.
- Ben-Porat T., Coto C., Kaplan A. S. *Virology*, 1966, 30, 74.
- Ben-Porat T., Kaplan A. S. *Virology*, 1967, 32, 457.
- Ben-Porat T., Kaplan A. S., Tennant R. W. *Virology*, 1967, 32, 445.
- Bentvelzen P. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 1972, 11, 259.
- Bentvelzen P., Aarssen A. M., Brinkhof J. *Nature New Biol.*, 1972, 239, 122.
- Benveniste R. E., Heinemann R., Callahan R., Todaro G. J. *Virol.*, 1974a, 14, 56.
- Benveniste R. E., Lieber M. M., Livingston D. M., Scolnick E., Todaro G. *Nature*, 1974b, 248, 17.
- Benveniste R. E., Lieber M. M., Todaro G. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974c, 71, 602.
- Benveniste R. E., Scolnick E. M. *Virology*, 1973, 51, 370.
- Benveniste R. E., Todaro G. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 3316.
- Benveniste R. E., Todaro G. J. *Nature*, 1974b, 252, 170.
- Benveniste R. E., Todaro G. J. *Nature*, 1974a, 252, 456.
- Benveniste R. E., Todaro G. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974b, 71, 4513.
- Benveniste R. E., Todaro G. J., Scolnick E., Parks W. J. *Virol.* 1973a, 12, 711.
- Benveniste R. E., Todaro G. J., Scolnick E. M., Parks W. P. J. *Virol.* 1973b, 12, 711.
- Berg P. *Proc. Roy. Soc. B*, 1971, 177, 65.
- Bernhard W. *Cancer Res.*, 1960, 20, 712.
- Bernhard W., Tournier P. *Ann. Inst. Pasteur*, 1964, 107, 447.
- Biggs P. M., Milne B. S., Graf T., Bauer H. J. *Gen. Virol.*, 1973, 18, 399.
- Billeter M. A., Parsons J. T., Coffin J. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 3560.
- Biquard J., Vigier P. *Virology*, 1972, 47, 444.
- Birkmayer G., Müller F., Baluda B. R., Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, 1972, 355, 1749.
- Blshop J. M., Levinson W., Sullivan D., Fanshier L., Quintrell N., Jackson J. *Virology*, 1970, 42, 927.
- Biczysko W., Pienkowski M., Solter D., Koprowski H. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1973, 51, 1041.
- Biczysko W., Solter D., Graham Ch., Koprowski H. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1974, 52, 483.

- Bilello J. A., Strand M., August J. T.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 3234.
- Bittner J. J.* Science, 1936, 84, 162.
- Black P. H.* J. Nat. Cancer Inst., 1966, 37, 487.
- Black P. H.* Ann. Rev. Microbiol., 1968, 22, 391.
- Black P. H.* J. Nat. Cancer Inst., 1974, 52, 545.
- Blair C. D., Duesberg P. H.* Nature, 1968, 220, 396.
- Blair P. D.* Israel J. Med., 1971, 7, 161.
- Bloch-Shtacher N., Rabinowitz Z., Sachs L.* Int. J. Cancer, 1972, 9, 632.
- Bobrow S. N., Smith R. G., Reitz M., Gallo R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 3228.
- Boettiger D.* Virology, 1974, 62, 522.
- Bolognesi D. P., Bauer H.* Virology, 1970, 42, 4, 1097.
- Bolognesi D. P., Graf T.* Virology, 1971, 43, 214.
- Bolognesi D. P., Luftig R., Shafer J. H.* Virology, 1973, 56, 2, 549.
- Borrel A.* Ann. Inst. Pasteur, 1903, 17, 112.
- Botchan M., Ozanne B., Sambrook J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4183.
- Bosc F. J.* Zbl. Bacteriol. Abt. Orig., 1903, 34, 417.
- Boyd V., Butel J. J.* Virol., 1972, 10, 399.
- Branton P. S., Cheevers W. P., Sheinin R.* Virology, 1970, 42, 979.
- Branton P. E., Sheinin R.* Virology, 1968, 36, 652.
- Breese S.* Arch. Gesamte Virusforsch., 1970, 30, 401.
- Britten R. J., Kohne D. E.* Science, 1968, 161, 529.
- Bukrinskaya A. G., Miller G. G., Lebedeva E., Zhdanov V. J.* Virol., 1974, 13, 478.
- Burkitt D.* Brit. J. Surg., 1958, 46, 218.
- Burnet F. M.* Principles of Animal Virology. N. Y., 1955.
- Burnett J. P., Mayne N., Helton L.* Nature, 1975, 254, 158.
- Cajano A.* VII Internat. Cancer Congr., 1958. London, 320.
- Cajano A.* Ristampato da Notiziario Antitlastici Simes, 1959, 1, 1.
- Calarco P. G., Szollosi D.* Nature New Biol., 1973, 243, 91.
- Callahan R., Benveniste R., Lieber M., Todaro G. J.* Virol., 1974, 14, 1394.
- Calnek B. W.* Avian Dis., 1968, 12, 104.
- Calnek B. W., Adldinger H. K., Kahn D. E.* Avian Dis., 1970, 14, 219.
- Calnek B. W., Witter R. L.* In «Diseases of Poultry». 6th Ed. Ames, 1972, 470.
- Canaani E., Helm K. V. D., Duesberg P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 401.
- Carroll R. D., Hager L., Dulbecco R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 3754.
- Carp R. I., Gilden R. V.* Virology, 1965, 27, 639.
- Carp R. I., Kit S., Melnick J. I.* Virology, 1966, 29, 503.
- Casarini J. P., DeMicco C.* Int. J. Cancer, 1972, 10, 174.
- Cassingena R., Tournier P.* C. R. Acad. Sci., 1968, 267, 2251.
- Cassingena R., Tournier P., May E., Estrade S., Bourali M. F.* C. R. Acad. Sci., 1969, 269, 261.
- Casto B. C. J.* Virol., 1968, 2, 641.
- Cavaleri L., Carrol F.* Nature, 1974, 232, 254.
- Chabot J. F., Beard D., Langlois N., Beard J.* Cancer Res., 1970, 30, 1287.
- Champe P. C., Strohl W. A., Schlesinger R. W.* Virology, 1972, 50, 482.
- Chan E. W., Schiop-Stansly P. E., O'Connor T. E. J.* Nat. Cancer Inst., 1974, 52, 469.
- Chan J. C., Vera N., East J. L., Hiraki S., Dmochowski L.* Cancer Res., 1974, 34, 468.
- Chang R. S. J.* Nat. Cancer Inst., 1968, 40, 491.
- Chang R. S.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1970, 135, 212.
- Chang R. S., Law L. W., Aoki T. J.* Nat. Cancer Inst., 1974, 52, 777.
- Chang R. S., Sinskey T. J.* J. Nat. Cancer Inst., 1968, 40, 505.
- Charney J., Moore D. H.* Nature, 1971, 229, 627.
- Chase D. G., Piko L. J.* Nat. Cancer Inst., 1973, 51, 1971.
- Chattopadhyay S. K., Lowy D. R., Teich N., Rowe W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 167.
- Chattopadhyay S., Rowe W. P., Teich N., Lowy D. R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 906.
- Cheevers W. P., Branton P. E., Sheinin R. J.* Virol., 1970a, 6, 573.

- Cheevers W. P., Branton P. E., Sheinin R. *Virology*, 1970b, 40, 768.
- Chen L. *Int. J. Cancer*, 1971, 7, 491.
- Chen J. H., Hanafusa H. J. *Virology*, 1974, 13, 340.
- Chen J. H., Hayward W. S., Hanafusa H. J. *Virology*, 1974, 14, 1419.
- Cheung K. S., Smith R. E., Stone M., Joklik W. *Virology*, 1972, 50, 851.
- Chieco-Bianchi L. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1974, 52, 1345.
- Chopra H., Ebert P., Woodside N. *Nature New Biol.*, 1973, 243, 159.
- Chopra H. C., Mason M. M. *Cancer Res.*, 1970, 30, 2081.
- Chou J. G., Martin R. G. J. *Virology*, 1974, 13, 1101.
- Claude A., Murphy J. B. *Physiol. Rev.*, 1933, 13, 246.
- Coffin J. M. J. *Virology*, 1972, 10, 153.
- Coffin J. M., Temin H. M. J. *Virology*, 1971a, 7, 625.
- Coffin J. M., Temin H. M. J. *Virology*, 1971b, 8, 630.
- Coffin J. M., Temin H. M. J. *Virology*, 1972, 9, 766.
- Colleman D. V., Gardner S. D., Field A. M. *Brit. Med. J.*, 1973, 3, 371.
- Collins C., Sauer G. J. *Virology*, 1972, 10, 425.
- Colcher D., Spiegelman S., Schlom J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 4975.
- Colter S. M., Essex M., Hardy W. D. *Cancer Res.*, 1974, 34, 1061.
- Cooper G. M., Temin H. J. *Virology*, 1974, 14, 1132.
- Coward J. E., Harter D. H., Morgan C. *Virology*, 1970, 40, 1030.
- Craig E., Tai J., Nichimoto T., McCroghan M., Zimmer S., Raskas H. *Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1974, p. 64.
- Crawford L. V. *Brit. Med. Bull.*, 1973, 29, 253.
- Crittenden L. B., Smith E. J., Weiss R., Sarma P. *Virology*, 1974, 57, 128.
- Crippa M., Tochini-Valentini G. P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 68, 2769.
- Croce C. M., Girardi A. J., Koprowski H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 12, 3617.
- Croce C. M., Koprowski H. *Virology*, 1973, 51, 227.
- Crocker B. P., Delvillano B. C., Jensen F., Lerner R., Dixon F. J. *Exptl. Med.*, 1974, 140, 1028.
- Culp L. A., Black P. H. J. *Virology*, 1972, 9, 611.
- Dahlberg J. E., Perk K., Dalton A. J. *Nature*, 1974a, 249, 828.
- Dahlberg J. E., Sawyer R. C., Faras A. J., Goodman H. M., Bishop J. M. J. *Virology*, 1974b, 13, 1126.
- Dalton A. J. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1972, 49, 323.
- Dalton A. J., Hellman A., Kalter S. S., Helmke R. J. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1974, 52, 1379.
- Daniel C. W., DeOme K. B., Joung J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 61, 53.
- Danna F., Nathans D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 2913.
- Danna K. J., Sack G. H., Nathans D. *J. Mol. Biol.*, 1973, 78, 363.
- Darai G., Munk L. *Nature New Biol.*, 1973, 241, 268.
- Darnell J. E., Wall R., Tushinski R. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 1321.
- Das M. R., Vaidya A. B., Sirsat S. M., Moore D. J. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1972, 48, 1191.
- Davis J., Gilden R., Oroszlan S. *Virology*, 1973, 56, 1, 411.
- Dawson P. J., Tacke R. B., Fieldsteel A. H. *Brit. J. Cancer*, 1968, 22, 589.
- Defendi V. *Progr. Exper. Tumour Res.*, 1966, 8, 125.
- Defendi V., Jensen F. *Science*, 1967, 157, 703.
- Defendi V., Lehman J. V. J. *Cellular and Compar. Physiol.*, 1965, 66, 351.
- Defillipes F. M. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 272, 125.
- Deichman G. I. In «*Adv. Cancer Res.*», 1969, 12, 101.
- Deinhardt F. In «*The Herpesviruses*», 1973, 595.
- Delius H., Westphal H., Axelrod N. J. *Mol. Biol.*, 1973, 74, 677.
- Del Villano B., Nave B., Crocker B. J. *Exptl. Med.*, 1975, 141, 172.
- Deng C. T., Boettiger D., Macpherson I., Varmus H. E. *Virology*, 1974, 62, 512.
- De Noronha F., Pest J. E., Norcross N. L., Ricard C. *Nature New Biol.*, 1972, 235, 14.
- Diamandopoulos G. T. *Science*, 1972, 176, 173.

- Dickson C.* J. gen. Virol., 1973, 20, 243.
- Dickson C., Hasham S., Nandi S.* Virology, 1974, 62, 242.
- Dickson C., Skehel J.* Virology, 1974, 58, 2, 387.
- Dion A. S., Vaidya A. B., Font G. S., Moore D. J.* Virol., 1974, 14, 40.
- Doerfler W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, 60, 636.
- Doerfler W.* Virology, 1969, 38, 587.
- Doerfler W., Burger H., Ortin J., Fanning E., Westphal M., Weiser B., Schick J.* Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1974, p. 65.
- Donner L., Sainerova H., Svoboda J., Scherneck S.* Int. J. Cancer, 1974, 13, 37.
- Dougherty R. M., Distefano H. S.* Virology, 1966, 29, 586.
- Dougherty R. M., Distefano H. S.* Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1974, 146, 481.
- Dougherty R. M., Distefano H. S., Roth F. K.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 58, 808.
- Dubbs D. R., Kit S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, 65, 536.
- Duesberg P. H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, 60, 1511.
- Duesberg P. H., Canaani E.* Virology, 1970, 42, 783.
- Duesberg P. H., Cardiff R. D.* Virology, 1968, 36, 696.
- Duesberg P. H., Helm K. V., Canaani E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971a, 68, 2505.
- Duesberg P., Helm K., Canaani E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971b, 68, 747.
- Duesberg P. H., Martin G. S., Vogt P. K.* Virology, 1970, 41, 631.
- Duesberg P. H., Robinson W. S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 219.
- Duesberg P. H., Robinson W. S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, 60, 1511.
- Duesberg P., Robinson H., Robinson W., Huebner R., Turner H.* Virology, 1968, 36, 73.
- Duesberg P. H., Vogt P. K.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 64, 939.
- Duesberg P. H., Vogt P. J.* Virol., 1973a, 12, 594.
- Duesberg P. H., Vogt P. K.* Virology, 1973b, 54, 207.
- Duesberg P. H., Vogt P. K., Lai M., Beemon K.* Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1974, 43.
- Duff R., Rapp F.* Nature New Biol., 1971a, 233, 48.
- Duff R., Rapp F. J.* Virol., 1971b, 8, 469.
- Duff R., Rapp F. J.* Virol., 1973, 12, 209.
- Dulbecco R.* Science, 1963, 142, 932.
- Dulbecco R.* Amer. J. Med., 1965, 38, 669.
- Dulbecco R.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1968, 33, 777.
- Dulbecco R. J.* Gen. Microbiol., 1973, 79, 7.
- Dulbecco R., Eckhart W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, 67, 1775.
- Dulbecco R., Hartwell L. H., Vogt M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 53, 403.
- Dulbecco R., Johnson T.* Virology, 1970, 42, 368.
- Dulbecco R., Vogt M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1960, 46, 1617.
- Dunkel V., Bast R., Gerwin B., Heine U., Cottler-Fox M., Borsos T. J.* Nat. Cancer Inst., 1974, 53, 591.
- Duran-Reynals F.* Texas Repts. Biol. and Med., 1957, 15, 754.
- Duran-Reynals F.* In «Physiopathology of Cancer». Ed. Stewart, 1958, 583.
- Duran-Reynals M. L.* Progr. Acad. Tumor Res., 1963, 3, 148.
- Duran-Reynals M. L.* Nat. Cancer Inst. Monogr., 1966, 22, 389.
- East J. L., Allen T., Knesek J. E., Bowen J. M., Dmochowski L. J.* Virol., 1973a, 11, 709.
- East J. L., Knesek J. E., Allen P. T., Dmochowski L. J.* Virol., 1973b, 12, 1049.
- East J. L., Knesek J. E., Allen P. T., Dmochowski L. J.* Virol., 1973c, 12, 1085.
- Ebert P. S., Pearson G. R.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974, 145, 298.
- Eckhart W.* Proc. Roy. Soc. B, 1971, 177, 59.
- Eckhart W., Dulbecco R.* Virology, 1974, 60, 359.
- Eckhart W., Dulbecco R., Burgei M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 283.
- Eckner R., Steeves R. A.* J. Exp. Med., 1972, 136, 832.
- Elder K. T., Smith A. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 2823.



- Ellermann V., Bang O. Zbl. Bakteriolog. Abt. Orig., 1908, 46, 585.
- Elliott A. G., Fraley E. E., Cleveland P. Science 1972, 179, 393.
- Emanoil-Ravicovitch R., Larsen C. J., Robin J., Boiron M. J. Virol., 1973, 12, 1625.
- Epstein M. A., Achong B. G. Ann. Rev. Microbiol., 1973, 27, 413.
- Epstein M. A., Hunt R. D., Rabin H. Int. J. Cancer. 1973, 12, 309.
- Epstein M. A., Zur Hausen H., Ball G., Rabin H. Int. J. Cancer, 1975, 15, 17.
- Erikson E., Erikson R. L. J. Virol., 1972, 9, 231.
- Erikson E., Erikson R. L., Henry B., Pace N. Virology, 1973, 53, 40.
- Erikson R. Virology, 1969, 37, 124.
- Erikson R. L., Erikson E., Walker T. A. Virology, 1974, 45, 527.
- Essex M. Oncology, 1972, 26, 345.
- Evans R. M., Baluda M. A., Shoyab M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 3152.
- Ezol H., Mak S. J. Virol., 1974, 14, 733.
- Falk F. A. Lab. Animal Sci., 1974, 34, 182.
- Fan H., Paskind M. J. Virol., 1974, 14, 421.
- Fanshier L., Garapin A., Mc Donnel J., Faras A., Levinson W., Bishop J. M. J. Virol., 1974, 7, 77.
- Faras A., Dahlberg J., Sawyer R., Harada E., Tylor J., Levinson W., Bishop J., Goodman H. J. Virol., 1974a, 13, 1134.
- Faras A. J., Erikson R. L. J. Virol., 1969, 4, 31.
- Faras A., Fanshier L., Garapin A., Levinson W., Bishop J. J. Virol., 1971, 7, 539.
- Faras A., Levinson W., Bishop J. M., Goodman H. Virology, 1974b, 58, 126.
- Faras A., Taylor J., McDonnel J., Levinson W., Bishop J. M. Biochemistry, 1972, 11, 2334.
- Favre M., Breitburd F., Croissant O., Orta G. Virology, 1974, 60, 572.
- Feldman D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 118.
- Feldman S. P., Schlom J., Spiegelman S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 1976.
- Ferrer J. F. Cancer Res., 1972, 32, 1871.
- Ferrer J. F., Abt D., Bhatt D. M., Marshak R. R. Cancer Res., 1974, 34, 893.
- Ferrer J. F., Avila L. A., Stock N. D. Cancer Res., 1972, 32, 1864.
- Fey F., Graffi A. Krebsforsch., 1965, 67, 145.
- Fieldsteel A. H., Dawson P. J., Kurahara C. Int. J. Cancer., 1971, 8, 304.
- Field A. M., Gardner S. B., Goodbody R. A., Woodhouse M. A. J. Clin. Pathol., 1974, 27, 341.
- Fiers W., Danna K., Rogiers R., Vandervoerde A., van Henverswyn H., Volckuert G. Abst., XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., 1974, p. 71.
- Fine D. L., Pienta R. J., Malan L. B., Kubicek M. J. Nat. Cancer Inst., 1974, 52, 1135.
- Finkel M., Biskis B., Jinkins P. Science, 1966, 151, 698.
- Finkelstein J. Z., McAllister R. M. J. Virol., 1969, 3, 353.
- Fischinger P. J., Moore C. D., O'Connor T. E. J. Nat. Cancer Inst., 1969, 42, 605.
- Fischinger P., Nomura S., Peebles P., Haapala D., Bassin R. Science, 1972, 176, 1033.
- Fischinger P. J., Nomura S., Tuttle N., Fuller G., Dunn K. Virology, 1974, 59, 217.
- Fischinger P. J., O'Connor T. E. Science, 1969, 165, 714.
- Fischinger P. J., O'Connor T. E. Virology, 1970, 41, 233.
- Fischinger P. J., Peebles P., Nomura S., Haapala D. J. Virol., 1973, 11, 978.
- Fleissner E. J. Virol., 1971, 8, 778.
- Flügel R. M., Wells R. D. Virology, 1972, 48, 394.
- Flügel R. M., Rapp U., Wells R. D. J. Virol., 1973, 12, 1491.
- Fogel M., Defendi V. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 58, 967.
- Fogel M., Sachs L. Virology, 1969, 37, 327.
- Fogel M., Sachs L. Virology, 1970, 40, 174.
- Foulds L. J. Chron. Dis., 1958, 8, 2.
- Fourcade A., Huynh T., Lacour F. J. Virol., 1974, 14, 407.
- Fowler A. K., McConahey P. S., Hellman A. J. Nat. Cancer Inst., 1973, 50, 1057.
- Fowler A. K., Reed C. D., Todaro G.,

- Hellman A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 2254.
- Fox T. O., Levine A. J. J. Virol., 1971, 7, 473.
- Francke B., Eckhart W. Virology, 1973, 55, 127.
- Frank J. J., Dorr G., Levy C. C. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 366, 353.
- Frankel J. W., Farrow W. M., Prickett C. O., Smith M. E., Campbell W. F. J. Nat. Cancer Inst., 1974, 52, 1491.
- Franker C. K., Gruca M. Virology, 1969, 37, 489.
- Franker C. K., Riebeck P. A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1968, 33, 80.
- Franklin R. B., Maldonado R. L., Bose H. R. Intervirology, 1974, 3, 342.
- Franks W. R., McGregor A., Chaw M. M., Skublies J. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 1959, 3, 19.
- Freeman A. E., Gilden R. V., Vernon M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 2415.
- Freeman A. E., Kelloff G. J., Vernon M. J. Nat. Cancer Inst., 1974, 52, 1469.
- Frenkel N., Roizman B., Cassai E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 3784.
- Fried M. Virology, 1965a, 25, 669.
- Fried M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965b, 53, 486.
- Fried A. H. J. Virol., 1972, 10, 1236.
- Fried A. H., Sokol F. J. Gen. Virol., 1972, 17, 69.
- Friis R. R. Virology, 1971, 43, 521.
- Friis R., Hunter E. Virology, 1973, 53, 479.
- Friis R. R., Toyoshima K., Vogt P. Virology, 1971, 43, 375.
- Fujinaga K., Green M. J. Virol., 1967, 1, 576.
- Fujinaga K., Green M. J. Mol. Biol., 1968, 31, 63.
- Fujinaga K., Green M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, 65, 375.
- Fujinaga K., Mak S., Green M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, 60, 959.
- Fujinaga K., Pina M., Green M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 64, 255.
- Fujinaga K., Rankin A., Yamazaki H., Sekikawa K., Bragdon J., Green M. Virology, 1973, 56, 484.
- Fujinami A., Inamoto K. Z. Krebsforsch., 1914, 15, 119.
- Fujita D., Chen J., Friis R., Vogt P. Virology, 1974, 60, 558.
- Furmanski P., Longley C., Fouchev D. J. Nat. Cancer Inst., 1974, 52, 975.
- Gaffney E. V., Fogh J., Ramos L., Loveless J. D. Cancer Res., 1970, 30, 1668.
- Gallagher R. E., Gallo R. C. Science, 1975, 187, 350.
- Gallagher R. E., Todaro G. J., Smith R., Livingston D., Todaro G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 1309.
- Gallo R. C. Nature, 1971, 234, 194.
- Gallo R. C., Abrell J. W., Robert M., Yang S., Smith R. J. Nat. Cancer Inst., 1972, 48, 1185.
- Gallo R. C., Miller N. R., Gallagher R., Sarin N., Abrell J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 3219.
- Gallo R. C., Yang S. S., Ting R. C. Nature, 1970, 228, 927.
- Garapin A., Fanshier L., Leong J., Jackson J., Levinson W., Bishop J. J. Virol., 1971b, 7, 227.
- Garapin A., Leong J., Fanshier L., Levinson W., Bishop J. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, 42, 919.
- Garapin A., McDonnel J., Levinson W., Quintrell N., Fanshier L., Bishop J. M. J. Virol., 1970, 6, 589.
- Garapin A., Varmus H., Faras A., Levinson W., Bishop J. Virology, 1973, 52, 264.
- Gardner S. D. Brit. Med. J., 1973, 1, 77.
- Gardner M., Officer J. E. Nature, 1971a, 232, 617.
- Gardner S. D., Field D. M., Coleman D. V. Lancet, 1971b, 1, 1253.
- Gardner M. B., Henderson B. E., Rongey R., Estes J. J. Nat. Cancer Inst., 1973a, 50, 719.
- Gardner M. B., Henderson B. E., Estes J., Rongey R. J. Nat. Cancer Inst., 1973b, 50, 1571.
- Gazdar A. F., Russell E., Sarma P. J. Virol., 1973, 12, 931.
- Gazdar A. F., Russell E. K., Minna J. D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974a, 71, 2642.
- Gazdar A. F., Sarma P. S., Bas-sin R. H. Int. J. Cancer., 1972, 9, 234.
- Gazdar A. F., Stull H. B., Chopra H., Ikausa Y. Internat. J. Cancer., 1974b, 13, 219.

- Geering G., Aoki T., Old L. *Nature*, 1960, 226, 265.
- Gelb L. D., Aaronson D. A., Martin M. A. *Science*, 1971b, 173, 1353.
- Gelb L. D., Kohne D. E., Martin M. A. *J. Mol. Biol.*, 1971a, 57, 129.
- Gelb L. D., Martin M. A. *Virology*, 1973, 51, 351.
- Gelb L. D., Milstein J. B., Martin M. A., Aaronson S. A. *Nature New Biol.*, 1973, 244, 76.
- Gelderblom H., Bauer H., Ogura H., Wegard R., Fischer B. *Int. J. Cancer*, 1974, 13, 246.
- Gerber P. *Science*, 1963, 140, 889.
- Gerber P. *Science*, 1964, 145, 833.
- Gerber P. *Virology*, 1966, 28, 501.
- Gerber P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 83.
- Gerber P., Hoyer B. H. *Nature*, 1971, 231, 46.
- Gershon D., Hansen P., Sachs L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1965, 54, 1584.
- Gershon D., Sachs L. *Virology*, 1963, 20, 567.
- Gershon D., Sachs L., Winocour E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 56, 918.
- Gerwin B. I., Todaro G., Zeve V., Scolnick E. N., Aaronson S. *Nature*, 1970, 228, 435.
- Gerwin B. I., Ebert P. S., Smith S., Albert S., Brennan M. *Science*, 1973, 180, 198.
- Gerwin B. I., Bassin R. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 2453.
- Gianni A., Smotkin D., Weinberg R. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 447.
- Gielkens A. L., Salden M. H., Bloemendal H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 4, 1093.
- Gilden R. V., Oroszlan S., Huebner R. *Nature New Biol.*, 1971, 231, 107.
- Gilden R. V., Toni R., Hanson M. J. *Immunology*, 1974, 112, 1250.
- Gillespie D., Marshall S., Gallo R. C. *Nature New Biol.*, 1972, 69, 227.
- Gillespie D., Spiegelman S. *J. Mol. Biol.*, 1965, 12, 829.
- Gillette R. W., Robertson S., Brown R., Blackman K. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1974, 53, 499.
- Girardi A. J., Jensen F. C., Koprowski H. J. *Cellular and Compar. Physiol.*, 1965, 65, 69.
- Girardi A. J., Weinstein D., Moorhead P. S. *Ann. Med. Exp. Fenn.*, 1966, 44, 242.
- Goldberg R. J., Scolnick E. M., Parks W. P., Dzikiidze E., Yakovleva L., Lapin B. *Int. J. Cancer*, 1974, 14, 722.
- Golde A. *Virology*, 1970, 40, 1022.
- Golde A., Latarjet R. C. *R. Acad. Sci.*, 1966, 262, 420.
- Goldstein S. *New Engl. J. Med.*, 1971, 285, 1120.
- Goodman N. C., Spiegelman S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 2203.
- Graf T. *Virology*, 1972, 50, 567.
- Graf T., Bauer H. *Colloq. Int. CNRS*, 1970, 183, 87.
- Graham F. L., Abrahams P. J., Warnaar S., Mulder C., de Vries F., Fiers W., van der Eb A. *Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1974, p. 26.
- Graham F. L., van der Eb A. J., Heijneker H. L. *Nature*, 1974, 251, 687.
- Granboulan N., Huppert J., Lacour F. *J. Mol. Biol.*, 1966, 16, 571.
- Grandgenett D. P., Gerard G. F., Green M. J. *Virology*, 1972, 10, 1136.
- Grandgenett D. P., Gerard G. F., Green M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 230.
- Graves D. C., Velicer L. F. *J. Virol.*, 1974, 14, 349.
- Green H. N. *Brit. Med. Bull.*, 1958, 14 (2), 101.
- Green M. *Ann. Rev. Biochem.*, 1970, 39, 701.
- Green M., Cartas M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 791.
- Green M., Hodap M. *J. Mol. Biol.*, 1972, 64, 305.
- Green M., Pina M., Kimes R., Wensink P., McHattie L., Thomas C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, 57, 1302.
- Green M., Rokutanda M., Fujinaga K., Ray R., Rokutanda H., Gurgo C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, 67, 385.
- Green M., Rokutanda H., Rokutanda M. *Nature New Biol.*, 1971, 230, 229.
- Green R. W., Bolognesi D. P., Schäfer W., Fister L., Hunsmann G., de Noronha F. *Virology*, 1973, 56, 565.
- Greenaway P. J. *FEBS Letters*, 1973, 34, 193.
- Greenberger J. S., Aaronson S. A. *Virology*, 1974, 57, 339.

- Greenberger J. S., Aaronson S. A. J. *Virology*, 1975, 15, 64.
- Greenberger J. S., Stephenson J. R., Moloney W. C., Aaronson S. A. *Cancer Res.*, 1975, 35, 245.
- Greene A. E., Toji L., Nichols W. W., Coriell L. *In vitro*, 1973, 9, 165.
- Gregoriades A., Old L. *Virology*, 1969, 37, 189.
- Griffith F. J. *Hyg.*, 1928, 27, 113.
- Gross L. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1951, 76, 27.
- Gross L. *Oncogenic viruses*. N. Y., 1970.
- Gross L. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1972, 220, 728.
- Gross L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 2013.
- Gulati S. C., Axel R., Spiegelman S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 2020.
- Guntaka R. V., Mahy B. W., Bishop J. M., Varmus H. E. *Nature*, 1975, 253, 507.
- Haas M., Vogt M., Dulbecco R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 2160.
- Haase A. T., Garapin A., Faras A., Taylor J., Bishop J. M. *Virology*, 1974a, 57, 251.
- Haase A., Garapin A. C., Faras A., Taylor J., Bishop J. M. *Virology*, 1974b, 57, 259.
- Hahn E. C., Sauer G. J. *Virology*, 1971, 8, 7.
- Halpern M. S., Wade E., Rucker E. *Virology*, 1973, 53, 287.
- Hampar B., Derge J. G., Martos L. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 69, 78.
- Hampar B., Derge J. G., Martos L., Nonoyama M. *Nature New Biol.*, 1973, 244, 214.
- Hampar B., Derge J., Showalter S. *Virology*, 1974a, 58, 298.
- Hampar B., Derge J. G., Nonoyama M., Tanaka A. *Virology*, 1974c, 62, 71.
- Hampar B., Tanaka A., Nonoyama M., Derge J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974b, 71, 631.
- Hanafusa H. *Nat. Cancer Inst. Mon.*, 1964, 17, 543.
- Hanafusa H., Baltimore D., Smoler D., Watson K., Yaniv A., Spiegelman S. *Science*, 1972b, 117, 1188.
- Hanafusa H., Hanafusa T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 532.
- Hanafusa H., Hanafusa T. *Virology*, 1968, 34, 630.
- Hanafusa H., Hanafusa T. *Virology*, 1971, 43, 313.
- Hanafusa T., Hanafusa H. *Virology*, 1973, 51, 247.
- Hanafusa H., Hanafusa T., Kawai S., Luginbuhl H. *Virology*, 1974, 58, 439.
- Hanafusa T., Hanafusa H., Miyamoto T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970c, 67, 1797.
- Hanafusa T., Hanafusa H., Miyamoto J. *Virology*, 1972a, 47, 475.
- Hanafusa H., Hanafusa T., Rubin H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1963, 49, 572.
- Hanafusa H., Hanafusa T., Rubin H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1964, 51, 41.
- Hanafusa H., Miyamoto T., Hanafusa T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970a, 66, 314.
- Hanafusa T., Miyamoto T., Hanafusa H. *Virology*, 1970b, 40, 55.
- Hanna M. G., Tennant R., Yuhas J. M. *Cancer Res.*, 1972, 32, 2226.
- Hardy W. D., Old L. J., Hess P. *Nature*, 1973, 244, 266.
- Harel L., Harel J., Huppert J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, 28, 44.
- Harrison D. E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 3184.
- Harter D. H., Axel R., Burny A., Spiegelman S. *Virology*, 1973, 52, 287.
- Hartley J. W., Rowe W. P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 780.
- Hartley J. W., Rowe W. P., Capps W., Huebner R. J. *Virology*, 1969, 3, 126.
- Hatanaka M., Dulbecco R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 56, 736.
- Hatanaka M., Huebner R. J., Gildea R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, 67, 143.
- Hatanaka M., Huebner R. J., Gildea R. V. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 10.
- Hatanaka M., Klein R., Toni R., Walker J., Gildea R. J. *Exptl. Med.*, 1973a, 138, 356.
- Hatanaka M., Klein R., Toni R., Walker J., Gildea R. J. *Exptl. Med.*, 1973b, 138, 364.
- Hatch G. G., McCormick K. J., Trentin J. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1973, 51, 519.
- Hausen P., Stein H. *Europ. J. Biochem.*, 1970, 14, 278.
- Hausen zur H. J. *Virology*, 1968, 2, 218.



- Hausen zur H., Schulte-Holthausen H. Nature, 1970, 227, 245.
- Hausen zur H., Sokol F. J. Virol., 1969, 4, 256.
- Hayflick J. Exptl. Cellular. Res., 1965, 37, 614.
- Hayflick L. J. Nat. Cancer. Inst., 1967, 26, 355.
- Hayflick L. Amer. J. Med. Sci., 1973, 265, 432.
- Hays E. F. Nature, 1966, 209, 1327.
- Hayward W. S., Hanafusa H. J. Virol., 1973, 11, 157.
- Hedgpeth J., Goodman H. M., Boyer H. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 3448.
- Hehlmann R., Kuze D., Spiegelman S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972a, 69, 435.
- Hehlmann R., Kuze D., Spiegelman S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972b, 69, 1727.
- Heiniger H. J., Meier H., Kaliss N. Cancer Res., 1974, 34, 201.
- Helman A., Peebles P. T., Strickland J. J. Virol., 1974, 14, 133.
- Helström I. J. Nat. Cancer Inst., 1963, 31, 1511.
- Henle W., Henle G. Cancer Res., 1973, 33, 1419.
- Henry P., Black P. H., Oxman M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 56, 1170.
- Henry P., Schnipper L., Samaha R., Crumpacker C., Lewis A., Levine A. J. Virol., 1973, 11, 665.
- Herpesvirus and cancer. Symp. In «Fed. Proc.», 1972, 31, 1625.
- Herzberg M., Winocour E. J. Virol., 1970, 6, 667.
- Hill M., Hillova J. Nature New Biol., 1972a, 237, 35.
- Hill M., Hillova J. Virology, 1972b, 49, 309.
- Hill M., Hillova J. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 335, 7.
- Hillova J., Goubin G., Couland D., Hill M. J. Gen. Virol., 1974, 23, 237.
- Hino S., Yoshida K., Enomoto J. Japan J. Exp. Med., 1974, 44, 179.
- Hino S., Yoshida K., Enomoto J., Oboshi S., Yamamoto T. Japan J. Exp. Med., 1974, 74, 101.
- Hirai K., Campbell G., Defendi V. In «Control Proliferat. Anim Cells». Cold Spring Harbor, 1974a, 151.
- Hirai K., Defendi V. J. Virol., 1972, 9, 705.
- Hirai K., Lehman J., Defendi V. J. Virol., 1971, 8, 708.
- Hirai K., Robb J., Defendi V. Virology, 1974, 59, 266.
- Hirsch M. S., Black P. H. Adv. Virus Res., 1974, 19, 265.
- Hirsch M. S., Ellis D. A., Kelly A. P., Proffitt M. R., Black P. H., Monaco A. P., Wood M. L. Int. J. Cancer, 1975, 15, 493.
- Hirsch M. S., Phillips S. M., Scolnick E., Todaro G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1069.
- Hitotsumachi S., Rabinowitz L., Sachs L. Int. J. Cancer, 1972, 9, 305.
- Hlozaneck I., Svoboda J. J. Gen. Virol. 1972, 8, 55.
- Hollis V., Aoki T., Barrera J., Oldstone M. J. Virol., 1974, 13, 448.
- Hooks J., Gibbs C. J., Chopra H. Science, 1972, 176, 1420.
- Hoover R., Fraumeni V. F. Lancet, 1973, 7820.
- Horsfall F. L. Canad. Med. Assoc. J., 1963, 89, 1224.
- Howik R. S., Rye L. A., Scolnick E. M., Parks W. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 2117.
- Hsiung G. D. J. Nat. Cancer Inst., 1972, 49, 567.
- Hsiung G. D., Fong C. K. J., Evans G. H. Intervirology, 1974, 3, 319.
- Hudson J. B. Canad. J. Microbiol., 1972, 18, 247.
- Huebner R. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 58, 835.
- Huebner R. J. In «Analytic and Experimental epidemiology of Cancer», 1973, 345.
- Huebner K., Groce C., Koprowski H. Virology, 1974, 59, 570.
- Huebner R. J., Hartley J. W., Rowe W., Lane W., Capps W. Proc. Nat. Acad. Sci., 1966, 56, 1164.
- Huebner R. J., Kelloff G. J., Sarma P., Lane W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, 67, 366.
- Huebner K., Koprowski H. Virology, 1974, 58, 609.
- Huebner K., Santoli D., Croce C. M., Koprowski H. Virology, 1975, 63, 512.
- Huebner R. J., Sarma P. S., Kelloff G. J., Gilden R. V., Meier H., Myers D. D., Peters R. L. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1971, 181, 246.
- Huebner R., Todaro G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 64, 1087.

- Human tumors associated with Herpesviruses, *Cancer Res.*, 1974, 34, 1083.
- Hung P. P. *Virology*, 1973a, 53, 463.
- Hung P. P. *Virology*, 1973b, 51, 287.
- Hung P. P., Robinson H. L., Robinson W. S. *Virology*, 1974, 43, 251.
- Hurwitz J., Leis J. J. *Virol.*, 1972, 9, 116.
- Ihle J. N., Hanna M. G., Robertson L. E., Kenney F. T. J. *Exptl. Med.*, 1974, 139, 1568.
- Ihle J. N., Hanna M., Schafer W. *Virology*, 1975, 63, 60.
- Ihle J. N., Yurconic M., Hanna M. G. J. *Exptl. Med.*, 1973, 138, 194.
- Ikawa J., Ross J., Leder L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 1154.
- Irlin I. S., Kissel'ov F. L., Tichonova Z. N., Zaretsky I. S., Bukovskiy A. F. *Bibl. Haemat.*, 1973, 39, 69.
- Ishizaki R., Langlois A. J., Chabot J., Shimazu T. J. *Virol.*, 1974, 8, 821.
- Ishizaki R., Shimizu T. *Cancer Res.*, 1970, 30, 2827.
- Jaenisch R. *Nature New Biol.*, 1972, 235, 46.
- Jaenisch R., Mintz B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 1250.
- Jarrett O., Pitts J. D., Whalley J., Clason A., Hay J. *Virology*, 1974, 43, 317.
- Jarrett W. J. *Clin. Pathol.*, 1972, 6, 43.
- Jarrett W. H. F., Jarrett O., Mackey L., Laird H., Hardy W. D., Essex M. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1973, 51, 833.
- Jehn U., Lindahl T., Klein G. J. *Gen. Virol.*, 1972, 16, 409.
- Jensen F. C., Koprowski H. *Virology*, 1969, 37, 687.
- Jeor S., Albrecht T., Funk F., Rapp F. J. *Virol.*, 1974, 13, 353.
- Johnston R. E., Bose H. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 46, 712.
- Kacian D. L., Watson K. F., Buruy A., Spiegelman S. *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 246, 365.
- Kajoki R. *Virology*, 1972, 48, 284.
- Kakefuda T., Bader J. P. J. *Virol.*, 1969, 4, 460.
- Kalter S. S., Helmke R. J., Heberling R., Panigel M. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1973, 50, 1081.
- Kalter S. S., Helmke R. J., Panigel N., Heberling R. *Science*, 1972, 179, 1332.
- Kamen R., Lindstrom D. M., Shure H. *Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1974, 60.
- Kang C. Y., Temin H. M. J. *Virol.*, 1973, 12, 1314.
- Kang C. Y., Temin H. M. J. *Virol.*, 1974, 14, 1179.
- Kaplan H. S. *Cancer Res.*, 1967, 27, 1325.
- Kaplan J. C., Wilbert S. M., Black P. H. J. *Virol.*, 1972, 9, 800.
- Karpas A., Milstein C. *Europ. J. Cancer*, 1973, 9, 295.
- Kato H., Sandberg A. A. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1968, 41, 1117.
- Kato K., Watanabe S., Yoshike K., Uchida S. J. *Gen. Virology*, 1974, 24, 425.
- Katz E., Margalith E. *Arch. ges. Virusforsch.*, 1973, 41, 290.
- Kawai S., Hanafusa H. *Virology*, 1974, 46, 470.
- Kawai S., Hanafusa H. *Virology*, 1972, 48, 126.
- Kawai S., Hanafusa H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 3493.
- Kawai S., Metroka C. E., Hanafusa H. *Virology*, 1972, 49, 302.
- Kawai Y., Nonoyama M., Pagano J. J. *Virol.*, 1973, 12, 1006.
- Kawakami T. G., Buckley P. M., McDowell T. S., De Paoli A. *Nature New Biol.*, 1973, 246, 105.
- Kawakami T. G., Huff S. D., Buckley P., Snyder S., Gilden R. *Nature*, 1972, 235, 170.
- Keith J., Gleason M., Fraenkel-Conrat H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 4371.
- Keller W., Crouch R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 3360.
- Kelloff G., Aaronson S. A., Gilden R. V. *Virology*, 1970c, 42, 1133.
- Kelloff G., Huebner R. J., Chang N. J. *Gen. Virol.*, 1970b, 9, 19.
- Kelloff G., Huebner R. J., Chang N., Oroszlan S. J. *Gen. Virol.*, 1970a, 9, 27.
- Kelloff G., Huebner R. J., Ley J., Oroszlan S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1969, 65, 310.
- Kelloff G., Huebner R., Long C., Gilden R. V. *Virology*, 1974, 46, 956.
- Kelly T., Lewis A. M. J. *Virol.*, 1973, 12, 643.
- Kelly T. J., Smith H. O. J. *Mol. Biol.*, 1970, 51, 393.

- Kennell S. J., del Villano B. C., Devi R. L., Lerner R. A. *Virology*, 1973, 55, 464.
- Keydar J., Gilead Z., Karby J. *Nature New Biol.*, 1973, 241, 49.
- Khoury G., Byrne J., Martin M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 1925.
- Khoury G., Byrne J. C., Takemoto K., Martin M. J. *Virol.*, 1973a, 11, 54.
- Khoury G., Lewis A. M., Oxman M., Levine A. *Nature New Biol.*, 1973b, 246, 202.
- Khoury G., Martin M. A. *Nature New Biol.*, 1972, 238, 4.
- Khoury G., Martin M., Lee T. N., Danna K., Nathaus D. J. *Mol. Biol.*, 1973c, 78, 377.
- Kidwell W., Saral R., Martin R. G., Ozer H. L. *J. Virol.*, 1972, 10, 410.
- Kiessling A. A., Neiman P. E. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 272, 147.
- Kimura G. *Nature*, 1975, 253, 639.
- Kimura G., Dulbecco R. *Virology*, 1972, 49, 394.
- Kimura G., Dulbecco R. *Virology*, 1973, 52, 529.
- Kimura G., Itagaki A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 673.
- King C. Y., Temin H. M. *J. Virology*, 1974, 14, 1179.
- Kirsten W. H., Mayer L. A., Wollmann R. L., Pierce M. I. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1967, 38, 117.
- Kit S., Brown M. J. *Virol.*, 1969, 4, 226.
- Kit S., Dubbs D. R. *Enzyme Induction by Viruses*. Karger, Basel, 1969.
- Kit S., Dubbs D. R., Somers K. In «Strategy of the viral genome», 1971, 229.
- Kit S., Kurimura T., Brown M., de Torres R. *J. Virol.*, 1970, 6, 69.
- Kit S., Kurimura T., Dubbs D. R. *J. Virol.*, 1969, 4, 558.
- Kit S., de Torres R. A., Dubbs D., Somers K. *J. Virol.*, 1967, 1, 738.
- Klein G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 1056.
- Klein G. In «The Herpesviruses», 1973.
- Klement V., Hartley J. W., Rowe W., McAllister R. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1969, 43, 925.
- Klement V., Nicolson M. O., Huebner R. J. *Nature*, 1971, 234, 12.
- Klement V., Nicolson M. O., Gilden R. V., McAllister R. *Nature New Biol.*, 1972, 238, 234.
- Kluchareva T. E., Shachanina K. L., Belova S., Deichman G. I. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1967, 39, 825.
- Knowles B. B., Jensen F. C., Steplewski Z. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 64, 42.
- Knowles B., Steplewski Z., Sweetly P. *Wistar Inst.*, 1969, 9, 37.
- Koprowski H. *Amer. J. Med.*, 1965, 38, 176.
- Koprowski H. *Fed. Proc.*, 1971, 30, 914.
- Koprowski H., Jensen F., Girardi A. *Cancer Res.*, 1966, 26, 1980.
- Koziorowska J., Wlodarski K., Mazurawa N. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1971, 46, 225.
- Kramarsky B., Sarkar N. H., Moore D. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 18, 1603.
- Krontiris T. G., Soeiro R., Fields B. N. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 2549.
- Kufe D., Hehlmann R., Spiegelman S. *Science*, 1972, 175, 182.
- Kufe D., Hehlman R., Spiegelman S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973a, 70, 5.
- Kufe D., Magrath I. T., Ziegler J. L., Spiegelman S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973b, 70, 737.
- Kufe D. W., Peters W. P., Spiegelman S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 3810.
- Kuff E. L., Lueders K. K., Ozer H. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 218.
- Kumar V., Bennett M., Eckner R. J. *J. Exptl. Med.*, 1974, 139, 1093.
- Lacour F., Fourcade A., Merlin E., Haynh T. *Cr. Acad. Sci.*, 1972, 274, 2253.
- Lai M. M. C., Duesberg P. H. *Nature*, 1972, 235, 383.
- Lai M. M. C., Duesberg P. H., Hörst G., Vogt P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 2266.
- Lai M. M. C., Nathans D. *Virology*, 1974, 60, 466.
- Landau B. J., Larson V. M., Devers G. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1966, 122, 1174.
- Lange J., Frank H., Hunsmann G., Moennig V., Wollmann R., Schäfer W. *Virology*, 1973, 53, 457.
- Langlois A. J., Beard D., Beard J. W. *Bibl. Haemat.*, 1970, 36, 96.
- Lapin B. A. *Bibl. Haemat.*, 1973, 39, 263.
- Larsen C. J., Emanoil-Ravicovitch R.,

- Samsø A., Robin J., Tavitian A., Boiron M.* Virology, 1973, 54, 252.
- Larsen C., Samsø A., Mauchauffe M., Ravicovitch R., Boiron M. C. R.* Acad. Sci., 1972, D275, 1453.
- Larson V. M., Gosnell P. A., Hilleman M. R.* Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1966, 122, 1182.
- Latarjet R., Cramer R., Montagnier L.* Virology, 1967, 33, 104.
- Lavialle C., Suarez H. G., Estrade S., Cassingena R.* Int. J. Cancer, 1974, 13, 311.
- Law L. W.* Cancer Res., 1969, 29, 1.
- Lecatsas G., Prozesky O. W., Van Wyk J.* Nature, 1973, 241, 343.
- Ledingham J. C. G., Gye W. E.* Lancet, 1935, 376.
- Lee L. F. J.* Virology, 1972, 10, 167.
- Lee J. C., Hanna M. G., Ihle J. J.* Virology, 1974, 14, 773.
- Lee S. Y., Mendecki J., Brawerman G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 1331.
- Lehman J. M., Defendi V. J.* Virology, 1970, 6, 738.
- Leis J. P., Hurwitz J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 69, 2331.
- Leis J., Hurwitz J. J.* Virology, 1972, 9, 130.
- Leong J. A., Garapin A. C., Fanshler L., Levinson W., Bishop J. M.* J. Virol., 1972, 9, 891.
- Lerner R. A., Jensen F., Kennel S., Dixon F.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 2965.
- Levin M. J., Oxman M. N., Levine A. S., Henry P., Enders J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 62, 589.
- Levine A. S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 717.
- Levine A. S., Levin M. J., Oxman M. N., Lewis A. M. J.* Virology, 1973, 11, 672.
- Levy J. A.* Science, 1973, 182, 1151.
- Levy J. A.* Nature, 1975, 253, 140.
- Levy J. A., Hartley J. W., Rowe W.* J. Nat. Cancer Inst., 1973, 51, 525.
- Lewis A. M., Levin M. J., Crumpacker C., Henry P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 63, 1128.
- Lieber M. M., Benveniste R. E., Livingston D., Todaro G.* Science, 1973, 182, 56.
- Lieber M. M., Livingston D. M., Todaro G. J.* Science, 1973, 181, 443.
- Lieber M., Sherr C., Potter M., Todaro G.* Int. J. Cancer, 1975, 15, 211.
- Lieber M. M., Sherr G. J., Todaro G. J.* Int. J. Cancer, 1974, 13, 587.
- Lieber M. M., Todaro G. J.* Int. J. Cancer, 1973, 11, 616.
- Lieberman M. L., Niwa O., Declève A., Kaplan H. S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 1250.
- Lilly F. J.* Nat. Cancer Inst., 1970, 45, 163.
- Lilly F. J.* Nat. Cancer Inst., 1972, 49, 927.
- Lilly F., Pincus T.* Cancer Res., 1973, 17, 231.
- Lilly F., Steeves R.* Biochim. Biophys. Acta, 1974, 355, 105.
- Lindberg U., Darnell J. E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, 65, 1089.
- Lingström D. M., Dulbecco R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1517.
- Linial M., Mason W. S.* Virology, 1973, 53, 258.
- Livingston D. M., Henderson I. C.* Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1974, 104.
- Livingston D. M., Todaro G. J.* Virology, 1973, 53, 142.
- Livingston D. M., Todaro G. J.* Intervirology, 1973, 1, 329.
- Lo A. C., Ball J. K.* Virology, 1974, 59, 545.
- Loeb L. J.* Nat. Cancer Inst., 1940, 1, 169.
- Lonai P., Declève A., Kaplan H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 2008.
- Long C., Sachs R., Huebner V., Hatanaka M., Gilden R.* Nature New Biol., 1973, 241, 147.
- Love D., Weiss R.* Virology, 1974, 57, 271.
- Lovinger G. G., Ling H. P., Klein R. A., Gilden R., Hatanaka M.* Virology, 1974, 62, 280.
- Lowy D. R., Chattopadhyay S., Teich N., Rowe W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 3555.
- Lowy D. R., Rowe W. P., Teich N.* Science, 1971, 174, 155.
- Lucas J. J., Ginsberg H. S. J.* Virology, 1971, 8, 203.
- Lwoff A.* Bacteriol. Rev., 1953, 17, 269.
- Maaten Van der M. J., Boothe A. D.* Arch. ges. Virusforsch., 1972, 37, 85.
- Machab J. C. M. J.* Gen. Virol., 1974, 24, 143.
- Machala O., Donner L., Svoboda J. J.* Gen. Virol., 1970, 8, 219.



- Macpherson J. *Science*, 1965, 148, 1731.  
 Macpherson I. *Adv. Cancer Res.*, 1970, 13, 169.  
 Macpherson I. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B*, 1971, 177, 41.  
 Maisel J., Klement V., Lai M., Duesberg P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 3536.  
 Major E. O., Dimayorca G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 3210.  
 Mak T. W., Manaster J., Howatson A., Till J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 4336.  
 Mak T. W., Kurtz S., Manaster J., Housman D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 623.  
 Maldonado R. L., Bose H. R. *J. Virol.*, 1973, 41, 741.  
 Mallucci L., Taylor-Papadimitrion J. *J. Gen. Virol.*, 1973, 21, 391.  
 Malmquist W. A., Krauss H. H., Moulton J. *Lab. Investig.*, 1972, 26, 528.  
 Manaker R. A., Groupe V. *Virology*, 1956, 2, 838.  
 Mangel W. F., Delius H., Duesberg P. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 4541.  
 Manly K. F., Smoler D. F., Bromfield E., Baltimore D. *J. Virol.*, 1971, 7, 106.  
 Manning J. S., Hackett A. J. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1972, 48, 417.  
 Mäntylä R. A., Arstilla P. P., Maurman O. H. *Infect. Immunity*, 1972, 6, 824.  
 Marin I. *J. Cellular Res.*, 1971, 9, 61.  
 Marin G., Littlefield J. W. *J. Virol.*, 1968, 2, 69.  
 Marin G., Macpherson I. *J. Virol.*, 1969, 3, 146.  
 Markham P. D., Baluda M. A. *J. Virol.*, 1973, 12, 721.  
 Martin G. M., Sprague C. A., Epstein M. *Lab. Invest.*, 1970, 23.  
 Martin G. S. *Nature*, 1970, 227, 1021.  
 Martin G. S., Duesberg P. H. *Virology*, 1972, 47, 494.  
 Martin M. A., Azelrod D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1969, 64, 1203.  
 Martin M. A., Byrne J. C. *J. Virol.*, 1970, 6, 463.  
 Martin M. A., Gelb L. D., Garon C., Takemoto K. *Virology*, 1974, 59, 179.  
 Maruyama H. B., Hatanaka M., Gilden R. V. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 1999.  
 Mason W. S., Friis R. R., Linial M., Vogt P. *Virology*, 1974, 61, 559.  
 May J. T., Somers K. D., Kit S. *J. gen. Virol.*, 1972, 16, 223.  
 Mayne N., Burnett J. P., Butler L. K. *Nature New Biol.*, 1971, 232, 182.  
 Mayo J., Lombardo J. L., Klein-Szanto A. *Cancer Res.*, 1973, 33, 2273.  
 McAllister R. M., Nicholson M., Gardner H., Gilden R., Huebner R. *Nature New Biol.*, 1973, 242, 75.  
 McAllister R., Nicholson M., Gardner M., Rongey R., Rasheed S., Sarma P., Huebner R., Hatanaka M., Oroszlan S., Gilden R., Vernon L. *Nature New Biol.*, 1972, 235, 3.  
 McAllister R. M., Nicolson M. O., Reed G., Kern J., Gilden R. V., Huebner R. J. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1969, 43, 917.  
 McCain B., Biswal N., Benyesh-Melnick M. J. *J. gen. Virol.*, 1973, 18, 69.  
 McCain K., Kirsten W. H. *Cancer Res.*, 1972, 32, 1470.  
 McClure H. M., Keeling M. E., Custer R. P., Marshak R. R., Abt D. A., Ferrer J. F. *Cancer Res.*, 1974, 34, 2745.  
 McDonnell J. P., Garapin A. C., Quintrell N., Bishop J. M. *Nature*, 1970, 228, 433.  
 McDugald L. V., Panem S., Kirsten W. H. *Int. J. Cancer*, 1970, 5, 64.  
 McGarry M. P., Steeves R. A., Eckner R. J., Mirand E. A., Trudel P. J. *Int. J. Cancer*, 1974, 13, 867.  
 McGrath C. M., Mahdi S., Joung L. J. *J. Virol.*, 1972, 9, 367.  
 McGuire P. M., Swart C., Hodge L. D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 1578.  
 Melendez L. V., Hung R. D., Daniel M. *Lab. Anim. Care*, 1969, 19, 378.  
 Melendez L. V., Hunt R. D., King N. W., Barahona H. H., Daniel M. D., Fraser C., Garcia F. *Nature New Biol.*, 1972, 235, 182.  
 Melli M., Whitfield C., Rao K., Richardson M., Bishop J. O. *Nature*, 1971, 231, 8.  
 Melnick J. L. *Progr. Med. Virol.*, 1972, 14, 321.  
 Melnick J. L., Allison A. C., Butel J. *Intervirology*, 1974, 3, 121.  
 Mertz J. E., Davis R. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 3370.

- Metcalf D.* «The Thymus». Springer. Berlin, 1966.
- Metcalf D.* Adv. Cancer Res., 1971, 14, 181.
- Meyer G., Lherisson A., Bonneau M.* Int. J. Cancer, 1969, 4, 520.
- Miller J., Miller E.* Adv. Cancer Res., 1953, 1, 339.
- Miller G.* Yale. J. Biol. Med., 1971, 43, 358.
- Miller G., Robinson J., Heston L.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4006.
- Miller J. F. A. P.* Adv. Cancer Res., 1961, 6, 78.
- Miller J. F. A. P.* In «Modern Trends in Pathology», 1967, 2, 140.
- Miller M., Hageman P. C., Daams J. H.* Nature New Biol., 1972, 237, 116.
- Miller N. R., Saxinger W. C., Reitz M. S., Gallo R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 3177.
- Milo G. E.* Exptl. Cellular Res., 1973, 79, 143.
- Minna J. D., Gazdar A. F., Iverson G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974b, 71, 1695.
- Minna J. D., Lueders K., Kuff E. L. J.* Nat. Cancer Inst., 1974a, 52, 1211.
- Minowada J.* Exper. Cellular Res., 1964, 33, 161.
- Mironi C., Schumann C.* Nature, 1975, 254, 60.
- Mizutani S., Boettiger D., Temin H.* Nature, 1970, 228, 424.
- Mizutani S., Temin H., Kodama M., Wells R.* Nature New Biol., 1971, 230, 232.
- Mizutani S., Temin H. J.* Virol., 1971, 8, 409.
- Mizutani S., Temin H. M. J.* Virol., 1973, 12, 440.
- Mizutani S., Temin H. J.* Virol., 1974, 13, 1020.
- Moennig V., Frank H., Lange F., Schafer W.* Virology, 1974, 61, 100.
- Mölling K.* Virology, 1974, 62, 46.
- Mölling K., Bolognesi D. P., Bauer H., Basen W., Hausen P.* Nature New Biol., 1971, 234, 240.
- Montagnier L., Golde A., Vigier P. J.* Gen. Virol., 1969, 4, 449.
- Moore D. H.* Cancer Res., 1974, 34, 2322.
- Moore D. H., Charney J., Kramarsky B., Lasfargues E. J., Sarkar N. H.* Nature, 1971, 229, 611.
- Moore D. H., Sarkar N. H., Kramarsky B.* Cancer Res., 1971, 28, 1415.
- Mora P. T., McFarland V. U., Luborsky S. W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, 55, 438.
- Moroni Ch.* Virology, 1972, 47, 1.
- Morrow J. F., Berg P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 3365.
- Morrow J. F., Berg P., Kelly T., Lewis A. J.* Virol., 1973, 12, 653.
- Mulder C., Delius H.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 3215.
- Mühlbock O., Dux A. J.* Nat. Cancer Inst., 1974, 53, 993.
- Nandi S., Helmich C. J.* Nat. Cancer Inst., 1974a, 52, 1285.
- Nandi S., Helmich C. J.* Nat. Cancer Inst., 1974b, 52, 1567.
- Nandi S., McGrath C. M.* Adv. Cancer Res., 1973, 17, 353.
- Narayan L., Weiner C.* Infection and Immunity, 1974, 10, 173.
- Nathans D., Danna D.* Nature New Biol., 1972, 236, 200.
- Nayak D. P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 1164.
- Nayak D. P., Murray P. R. J.* Virol., 1973, 12, 177.
- Nazerian K.* Adv. Cancer Res., 1973, 17, 279.
- Nazerian K., Linduke T., Klein G., Lee L. J.* Virol., 1973, 12, 841.
- Neiman P. E.* Science, 1972, 178, 750.
- Neiman P. E.* Nature New Biol., 1973a, 244, 62.
- Neiman P. E.* Virology, 1973b, 53, 196.
- Neiman P. E., Wright S. E., McMillin E., McDonnell D. J.* Virol., 1974, 13, 837.
- Nelson-Rees W. A., Zhdanov V. M., Hawthorne P. K., Flandermeyer R. R.* J. Nat. Cancer Inst., 1974, 53, 751.
- Niall H. D., Sauer R., Allen D. W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, 67, 1804.
- Nichols W. W.* Ann. Rev. Microbiol., 1970, 24, 479.
- Nichols J. L., Waddell M.* Nature New Biol., 1973, 243, 236.
- Nomura S., Bassin R. H., Turner W. J.* Gen. Virol., 1972b, 14, 213.
- Nomura S., Dunn K. J., Fischinger P. J.* Nature, 1973b, 246, 213.
- Nomura S., Dunn K. J., Mattern C. J.* Gen. Virol., 1974, 25, 207.
- Nomura S., Fischinger P. J., Dunn K., Mattern C.* Virology, 1972a, 50, 51.
- Nomura S., Fischinger P. S., Mat-*

- tern C., Dunn K. *Virology*, 1973a, 56, 152.
- Nonoyama M., Huang C. H., Pagano G., Klein G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 3265.
- Nonoyama M., Kawai Y., Huang C. H., Pagano J. S., Hirshaut Y., Levine P. H. *Cancer Res.*, 1974, 34, 1228.
- Nonoyama M., Pagano J. *Nature New Biol.*, 1971, 233, 103.
- Nonoyama M., Pagano J. S. *Nature New Biol.*, 1972, 238, 169.
- Nonoyama M., Tanaka A. *Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1974, 55.
- Nowinski R. C., Edynak E., Sarkar N. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971b, 68, 1613.
- Nowinski R. C., Fleissner E., Sarkar N. H. In *Persistent Virus Infections*. N. Y., 1973, 31.
- Nowinski R. C., Fleissner E., Sarkar N., Aoki T. J. *Viol.*, 1972b, 9, 359.
- Nowinski R. C., Sarkar N. H., Old L., Moore D., Hilgers J. *Virology*, 1971, 46, 21.
- Nowinski R. C., Watson K. F., Janiv R., Spiegelman S. J. *Viol.*, 1972a, 10, 959.
- Obara T., Bolognesi D., Bauer H. *Int. J. Cancer*, 1971, 7, 535.
- Obata Y., Ikeda H., Stockert E. J. *Exptl. Med.*, 1975, 141, 188.
- Oberling C. *The riddle of Cancer* London. Yale Univ. Press, 1944.
- Obukh I. B., Altstein A. D., Kryukova I. N. *Neoplasma*, 1973, 20, 551.
- Obukh I. B., Kryukova I. N. *Int. J. Cancer*, 1969, 4, 809.
- Obukh I. B., Kryukova I. N., Biryulina T. I. *Int. J. Cancer*, 1969, 4, 799.
- Oda K., Dulbecco R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968a, 60, 525.
- Oda K., Dulbecco R. *Virology*, 1968b, 35, 439.
- Odaka T. J. *Viol.*, 1975, 15, 332.
- Oey J., Vogel A., Pollack R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 694.
- Ogura H., Friis R., Bauer H. *Z. Naturforsch.*, 1974a, 29c, 437.
- Ogura H., Gelderblom H., Bauer H. *Intervirology*, 1974b, 4, 69.
- Okabe H., Gilden R. V., Hatanaka M. *J. Virol.*, 1973a, 12, 984.
- Okabe H., Gilden R. V., Hatanaka M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973b, 70, 3923.
- Okabe H., Gilden R. V., Hatanaka M. *Nature New Biol.*, 1973c, 244, 54.
- Okabe H., Gilden R. V., Hatanaka M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 3278.
- Old L. J., Boyse E. A. *Harvey Lect.*, 1973, 67, 273.
- Oldstone M., Aoki T., Dixon F. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 134.
- Olson C., Miller L. D., Miller J. M., Hoss H. E. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1972, 49, 1463.
- Oncogenesis a. Herpesviruses. Eds. Biggs P., de The G. Payne L. Lyon, 1972.
- Orgel L. E. *Nature*, 1973, 243, 441.
- Oroszlan S., Bova D., Huebner R., Gilden R. J. *Viol.*, 1972b, 10, 746.
- Oroszlan S., Bova D., White M., Toni R., Gilden R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972a, 69, 1211.
- Oroszlan S., Copeland T., Summers M., Gilden R. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 1972, 48, 1549.
- Oroszlan S., Copeland T., Summers S., Gilden R. *Science*, 1973, 181, 454.
- Oroszlan S., Fisher C., Stanley F., Gilden R. *J. gen. Virol.*, 1970, 8, 1.
- Oroszlan S., Foreman C., Kelloff G., Gilden R. *Virology*, 1971a, 43, 665.
- Oroszlan S., Huebner R., Gilden R. V. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971b, 68, 901.
- Osborn J. E., Robertson S. M., Padgett B., Zu Rhein G. J. *Viol.*, 1974, 13, 614.
- Owada M., Toyoshima K. *Virology*, 1973, 54, 170.
- Ozman M. N., Takemoto K. J., Eckhart K. *Virology*, 1972, 49, 675.
- Ozanne B. J. *Viol.*, 1973, 12, 79.
- Ozanne B., Sharp P. A., Sambrook J. J. *Viol.*, 1973, 12, 90.
- Ozanne B., Vogel A. J. *Virology*, 1974, 14, 239.
- Packer L., Smith V. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 4763.
- Padgett B. L., Walker D. L. *J. Infect. Dis.*, 1973, 127, 467.
- Padgett B. L., Walker D. L. *Zu Rhein G. Lancet*, 1971, 1, 1257.
- Panem S., Schauf V. J. *Viol.*, 1974, 13, 1169.
- Papageorge A. G., Peebles P. T., Gerwin B. I., Fischinger P. J., Matern E. T. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1974, 52, 1727.
- Paran M., Gallo R. C., Richardson L. S.,

- Wu A. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 8, 2391.
- Parks W. P., Gilden R. V., Bykovsky A. F., Miller G. G., Zdanov V. M. J. Virol., 1973, 12, 1540.
- Parks W. P., Howik R. S., Scolnick E., Gilden R. J. Virol., 1974b, 13, 1200.
- Parks W. P., Scolnick E. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972b, 69, 1766.
- Parks W. P., Scolnick E. M., Noon M., Todaro G. Int. J. Cancer, 1973a, 12, 129.
- Parks W. P., Scolnick E. M., Ross J., Todaro G., Aaronson S., J. Virol., 1972a, 9, 110.
- Parks W., Scolnick E., Tronick S., Todaro G. J. Virol., 1974a, 14, 430.
- Parks W. P., Todaro G. Virology, 1972, 47, 673.
- Parks W. P., Todaro G. J., Scolnick E., Aaronson S. Nature, 1971, 229, 258.
- Parson J. T., Coffin J. M., Bromley P., Weissman Ch. J. Virol., 1973, 11, 761.
- Parson P. G., Goss P., Pope J. H. Int. J. Cancer, 1974, 13, 606.
- Parsons G. T., Green M. Virology, 1971, 45, 154.
- Pattengale P., Ikeda H., Thorbecke G. Cancer Res., 1974, 34, 810.
- Patterson M. K. J. Nat. Cancer Inst., 1974, 53, 1493.
- Paul D., Henahan M., Walter S. J. Nat. Cancer Inst., 1974, 53, 1499.
- Paulin D., Cuzin F. J. Virol., 1975, 15, 393.
- Payment P., Chagnon A., Côte J. Canad. J. Microbiol., 1972, 18, 369.
- Payne L. N. In «Analytic and Experimental Epidemiology of Cancer». Tokyo, 1973, 235.
- Payne L. N., Chubb R. C. J. Gen. Virol., 1968, 3, 379.
- Payne L. N., Pani P. K., Weiss R. A. J. Gen. Virol., 1971, 13, 455.
- Peebles P. T., Fischinger P. J., Basin R. H., Papageorge A. G. Nature New Biol., 1973, 242, 98.
- Peled A., Haran-Ghera N. Int. J. Cancer, 1971, 8, 97.
- Penney J. B., Narayan O. Infect. a Immunity, 1973, 8, 299.
- Peters W., Kufe D., Schlom J., Frankel J., Prickett C., Groupe V., Spiegelman S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 3175.
- Peters R. L., Rabstein L. S., Spahn G. Int. J. Cancer, 1972, 10, 273.
- Peters R. L., Spahn G. J., Rabstein L. J. Nat. Cancer Inst., 1973a, 51, 621.
- Peters R. L., Spahn G. J., Rabstein L. Science, 1973b, 181, 665.
- Petersen E. E., Mueller N., Henfer M., Brundner G. Arch. ges. Virusforsch., 1972, 39, 381.
- Peterson D. A., Baxter-Gebbard K. L., Levine A. S. Virology, 1972, 47, 251.
- Peterson R. D., Burmester B. R., Fredrickson T. N., Purchase H. G., Good R. A. J. Nat. Cancer Inst., 1964, 32, 1343.
- Peterson R. D., Purchase H. G., Burmester B. R., Cooper M. D., Good R. A. J. Nat. Cancer Inst., 1966, 36, 585.
- Petric M., Hudson J. B. Can. J. Biochem., 1972, 50, 927.
- Phillips L. A., Park J. J., Hollis V. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4366.
- Philipson L., Petterson U., Lindberg U., Tibbets C. Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1974, 61.
- Pienta R., Fine D. L., Hurt T. J. Nat. Cancer Inst., 1972, 48, 1913.
- Pincus T., Hartley J. W., Rowe W. P. J. Exptl. Med., 1971a, 133, 1219.
- Pincus T., Rowe W. P., Lilly F. J. Exptl. Med., 1971b, 133, 1234.
- Piraino F. Virology, 1967, 32, 700.
- Pollack R., Wolman S., Vogel A. Nature, 1970, 228, 967.
- Pollack R. E., Hough P. Ann. Rev. Med., 1974, 25, 431.
- Pollack R., Green H., Todaro G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, 60, 126.
- Pollack R., Vogel A. J. Cellular Physiol., 1973, 82, 93.
- Ponten J. Int. J. Cancer, 1970, 6, 323.
- Pope J. H. Austr. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 1962, 40, 263.
- Porter D., Porter H., Cox N. A. J. Immunol., 1973, 111, 1626.
- Portolani M., Barbanti - Brodano G., La Placa M. J. Virol., 1975, 15, 420.
- Priori E. S., Anderson D. E., Williams W. C., Dmochowski L. J. Nat. Cancer Inst., 1972, 48, 1131.
- Prives G., Aviv H., Revel M., Winocour E. Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1974, 88.
- Purchase H. G., Ludford C., Naze-



- rian K. J. Nat. Cancer Inst., 1973, 51, 489.
- Quade K., Smith R. E., Nickols J. L. Virology, 1974a, 62, 60.
- Quade R., Smith R., Nickols J. J. Virology, 1974b, 61, 287.
- Quintrell N., Varmus H. E., Bishop J. M. Virology, 1974, 58, 568.
- Rabin E. Z., Mustard M., Fraser M. J. Canad. J. Biochem., 1968, 46, 1285.
- Rabinowitz Z., Sachs L. Nature, 1968, 220, 1203.
- Rabinowitz Z., Sachs L. Virology, 1969, 38, 336.
- Rabinowitz Z., Sachs L. Nature, 1970, 225, 136.
- Rabinowitz Z., Sachs L. Int. J. Cancer, 1972, 10, 607.
- Rabotti G. F., Blackham I. J. Nat. Cancer Inst., 1970, 44, 985.
- Ralph R. K., Colter J. S. Virology, 1972, 48, 49.
- Randerath K., Rosenthal L. J., Zamechnik P. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 3233.
- Rangan S. R. S. Lab. Animal Sci., 1974, 24, 193.
- Rapp F. J. Nat. Cancer Inst., 1973, 50, 825.
- Rapp F. Adv. Cancer Res., 1974, 19, 265.
- Rapp F., Trulock S. C. Virology, 1970, 40, 961.
- Raska K., Strohl W. A. Virology, 1972, 47, 734.
- Raskas H. Nature New Biol., 1971, 233, 134.
- Reamer R. H., Okazaki W. J. Nat. Cancer Inst., 1971, 44, 763.
- Renger H. C., Nature New Biol., 1972, 240, 19.
- Renger H. C., Vasilico C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 109.
- Renger H., Basilico C. J. Virol., 1973, 11, 702.
- Rhim J. S., Duh F. G., Cho H., Vernon M. J. Nat. Cancer Inst., 1973a, 51, 1327.
- Rhim J. S., Vernon M. L., Duh F. G., Huebner R. J. Int. J. Cancer, 1973, 12, 734.
- Rho H. M., Green M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 2386.
- Rich M. A., Johns L. W. J. Nat. Cancer Inst., 1968, 41, 1463.
- Rickinson A. B., Jarvis J. E., Crawford D. H., Epstein M. A. Int. J. Cancer, 1974, 14, 704.
- Rifkin D. B., Compans R. W. Virology, 1971, 46, 485.
- Riman J., Beaudreau G. S. Nature, 1970, 228, 427.
- Risser R., Pollack R. Virology, 59, 477, 1974.
- Robb J. A., Martin R. G. J. Virol., 1972, 9, 956.
- Robb J. A., Tegtmeyer P., Iskikawa A., Ozer H. J. Virol., 1974, 13, 662.
- Robb J. A., Tegtmeyer P., Martin R., Kit S. J. Virol., 1972, 9, 562.
- Robert M. S., Smith R. G., Gallo R., Abrell J. Science, 1972, 176, 798.
- Robin J., Larsen C. J., Bazilier M., Boiron M. FEBS Letters, 1972, 27, 58.
- Robinson W. S., Baluda M. A. J. Virol., 1965, 54, 1686.
- Robinson W. S., Hung P., Robinson H., Ralph D. J. Virol., 1970, 6, 695.
- Robinson W. S., Pitkanen A., Rubin H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, 54, 137.
- Robinson W. S., Robinson H. L. Virology, 1971, 44, 457.
- Robinson W. S., Robinson H. L., Duesberg P. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, 58, 825.
- Robl M. G., Gordon D. E., Lee K., Olson K. Cancer Res., 1972, 32, 2221.
- Rogers S., Lowenthal A., Ferheggen A., Columbo J. J. Exptl. Med., 1973, 137, 1091.
- Roizman B. J. Reticul. Soc., 1974, 15, 312.
- Roizman B., Frenkel N. Cancer Res., 1973, 33, 1402.
- Rokutanda M., Rokutanda H., Green M. Nature, 1970, 227, 1026.
- Rongey R. W., Hlavackova A., Lara S. J. Nat. Cancer Inst., 1973, 50, 1581.
- Rosenthal P. N., Robinson H. L., Robinson W., Hanafusa T., Hanafusa H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 2336.
- Rosenthal L. J., Zamechnik P. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 1184.
- Ross J., Scolnick E., Todaro G., Aaronson S. Nature New Biol., 1971, 231, 163.
- Ross J., Tronick S. R., Scolnick E. M. Virology, 1972, 49, 230.
- Rossi C. R., Kiesel G. K. In vitro, 1973, 9, 147.

- Roth J. K., Meyers P., Dougherty R. M. *Virology*, 1971, 45, 265.
- Rous P. J. *Amer. Med. Assoc.*, 1911, 56, 198.
- Rous P. J. *Amer. Med. Assoc.*, 1943, 122, 573.
- Rous P., Fridewald W. F. *Science*, 1941, 94, 495.
- Rous P., Kidd J. G. *J. Exper. Med.*, 1938, 67, 399.
- Rous P., Lange L. B. *J. Exper. Med.*, 1913, 18, 651.
- Rous P., Murphy J. J. *J. Exper. Med.*, 1914, 19, 52.
- Rowe W. P., *Bact. Rev.*, 1961, 25, 18.
- Rowe W. P. *Cancer Res.*, 1973, 33, 3061.
- Rowe W. P., Hartley J. W., Lander M. *Virology*, 1971, 46, 866.
- Rowe W. P., Lowy D. R., Teich N. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 1033.
- Rowe W. P., Pugh W. E., Hartley J. W. *Virology*, 1970, 42, 1136.
- Rowe W. P., Sato H. *Science*, 1973, 180, 640.
- Roy-Burman P., Kaplan M. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 48, 1354.
- Roy-Burman P., Pal B. K., Gardner M. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 56, 543.
- Roy-Burman P., Rongey R. W., Henderson B. E., Gardner M. B. *Nature New Biol.*, 1973, 244, 146.
- Rozenblatt S., Winocour E. *Virology*, 1971, 43, 300.
- Rozenblatt S., Winocour E. *Virology*, 1972, 50, 558.
- Rubin H., Fanshier L., Cornelius A., Hughes W. *Virology*, 1963, 17, 143.
- Ruoslahti E., Vaheri A., Estola T., Sandelin K. *Int. J. Cancer*, 1973, 11, 595.
- Ruprecht R. M., Goodman N. C., Spiegelman S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 1437.
- Rusch I. H. *Cancer Res.*, 1954, 14, 407.
- Rymo L., Parsons J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 2782.
- Sabin A. B., Koch M. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1963, 50, 407.
- Sachs L. *Nature*, 1965, 207, 1272.
- Sack G. H., Narayan O., Danna K., Nathans D. *Virology*, 1973, 51, 345.
- Sambrook J. *Adv. Cancer Res.*, 1972, 16, 141.
- Sambrook J., Pettersson U., Ozanne B., Sharp P. A. *Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1974, 25.
- Sambrook J., Sharp P. A., Keller W. *J. Mol. Biol.*, 1972, 70, 61.
- Sambrook J., Sugden B., Keller W., Sharp P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 3711.
- Sambrook J., Westphal H., Dulbecco R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 60, 1288.
- Sandord K. K. *Int. Rev. Cytol.*, 1965, 18, 249.
- Sarin P. S., Gallo R. *Internat. Rev. Sci., Ser. Biochem.*, 1973, 6.
- Sanford K. K. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1967, 39, 705.
- Sanford K. K. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1974, 53, 1481.
- Sarkar N. H., Moore D. H. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1972, 48, 1051.
- Sarma P. S., Log T. *Virology*, 1973, 54, 160.
- Sarma P. S., Log T., Huebner R. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, 65, 81.
- Sarma P. S., Sharar A., Tseng J. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1974, 145, 757.
- Sarma P. S., Sharar A., Welters V. *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, 1974, 145, 560.
- Sarma P. S., Tseng J., Lee J., Gildea R. *Nature New Biol.*, 1973, 244, 56.
- Sarngadharan M. G., Sarin P. S., Reitz M., Gallo R. *Nature New Biol.*, 1972, 240, 67.
- Sauer G., Defendi V. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 56, 452.
- Sauer G., Hahn E. C. *Z. Krebsforsch.*, 1970, 74, 40.
- Sauer G., Kidwai J. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 61, 1256.
- Sauer G., Koprowski H., Defendi V. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, 58, 599.
- Sawyer R. C., Dahlberg J. E. *J. Virol.*, 1973, 12, 1226.
- Sawyer R. C., Harada F., Dahlberg J. E. *J. Virol.*, 1974, 13, 1302.
- Schäfer W., Anderer F., Fauer H., Pister L. *Virology*, 1969, 38, 387.
- Schäfer W. P., Fischinger P. J., Lange J., Pister L. *Virology*, 1972a, 47, 197.

- Schäfer W., Lange J., Bolognesi D., Richard C. *Virology*, 1971, 44, 73.
- Schäfer W., Lange J., Fischinger P., Bolognesi D., Pister L. *Virology*, 1972b, 47, 210.
- Scheele C. M., Hanafusa H. *Virology*, 1971, 45, 401.
- Scheele C. M., Hanafusa H. *Virology*, 1972, 50, 753.
- Schidlovsky G., Ahmed M. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1973, 51, 225.
- Schincariol A. L., Joklik W. *Virology*, 1973, 56, 532.
- Schlom J., Colcher D., Spiegelman S., Gillespie S. *Science*, 1973, 179, 696.
- Schlom J., Harter D. H., Burny A., Spiegelman S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971b, 68, 182.
- Schlom J., Spiegelman S. *Science*, 1971a, 174, 840.
- Schlom J., Spiegelman S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971b, 68, 1613.
- Schlom J., Spiegelman S., Moore D. *Nature*, 1971a, 231, 97.
- Schlom J., Spiegelman D., Moore D. H. *Science*, 1972b, 175, 542.
- Schlom J., Spiegelman S., Moore D. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972c, 48, 1197.
- Schwartz S. A., Panem S., Kirsten W. *Cancer Res.*, 1974, 34, 2255.
- Scolnick E. M., Aaronson S. A., Todaro G. J., Parks W. P. *Nature*, 1971, 229, 318.
- Scolnick E. M., Benveniste R., Parks W. J. *Viol.*, 1973a, 11, 600.
- Scolnick E. M., Maryak J. M., Parks W. P. *J. Virol.*, 1974, 14, 42.
- Scolnick E. M., Parks W. P. *J. Virol.*, 1974a, 13, 1211.
- Scolnick E. M., Parks W. P. *Virology*, 1974b, 59, 168.
- Scolnick E. M., Parks W., Kohne D., Gilden R., Hatanaka M. *J. Virol.*, 1974, 13, 363.
- Scolnick E. M., Parks W., Livingston D. M. *J. Immunol.*, 1972b, 109, 570.
- Scolnick E. M., Parks W. P., Todaro G. J. *Science*, 1972a, 177, 1119.
- Scolnick E. M., Parks W. P., Todaro G. J., Aaronson S. A. *Nature New Biol.*, 1972a, 235, 35.
- Scolnick E. M., Rands E., Williams D., Parks W. P. *J. Virol.*, 1973b, 12, 458.
- Scolnick E. M., Raub E., Aaronson S. A., Todaro G. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, 70, 1789.
- Scolnick E. M., Stephenson J. R., Aaronson S. A. *J. Virol.*, 1972c, 10, 653.
- Seemayer N. H., Defendi V. *J. Virol.*, 1973, 12, 1265.
- Seemayer N. H., Defendi V. *J. Virol.*, 1974, 13, 36.
- Seemayer N. H., Hirai K., Defendi V. *Int. J. Cancer*, 1973, 12, 524.
- Sekiya S. *Cancer Res.*, 1971, 28, 789.
- Shah K. V., Daniel R. W., Warszawski R. M. *J. Infect. Dis.*, 1973, 6, 784.
- Shah K. V., Daniel R. W., Zeigel R. E., Murphy G. P. *Transplantation*, 1974, 17, 131.
- Shah K. V. *Amer. J. Epidemiol.*, 1972, 95, 199.
- Shah K. V., Daniel R., Murphy G. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1973, 51, 687.
- Shani M., Huberman E. *Virology*, 1974, 61, 303.
- Shani M., Rabinowitz Z., Sachs L. *J. Virol.*, 1972, 10, 456.
- Shanmugam G., Bhaduri S., Green M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 56, 687.
- Sheinin R. *Virology*, 1966a, 28, 621.
- Sheinin R. *Virology*, 1966b, 29, 167.
- Sherr Ch. J., Benveniste R. E., Todaro G. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974a, 71, 3721.
- Sherr Ch. J., Lieber M. M., Benveniste R., Todaro G. *Virology*, 1974c, 58, 492.
- Sherr Ch. J., Lieber M. M., Todaro G. *J. Cell.*, 1974b, 1, 55.
- Sherr C. J., Todaro G. *Virology*, 1974a, 61, 168.
- Sherr C. J., Todaro G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974b, 71, 4705.
- Sherr C. J., Todaro G. *J. Science*, 1975, 187, 855.
- Shih T., Khoury G., Martin M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 3506.
- Shimada K., Fujinaga K., Sesikawa K., Ito K. *J. Virol.*, 1972, 10, 648.
- Shimojo H., Yamashita T. *Virology*, 1968, 36, 422.
- Shimono H., Kaplan A. S. *Virology*, 1969, 37, 690.
- Shiroki K., Shimojo H. *Virology*, 1971, 45, 163.
- Shope R. E. *J. Exper. Med.*, 1932, 56, 803.

- Shope R. E. J. *Exper. Med.*, 1933, 58, 607.
- Shope T., Dechario D., Miller G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 2487.
- Shoyab M., Baluda M. A. *J. Virol.*, 1973, 12, 534.
- Shoyab M., Baluda M. A., Evans R. *J. Virol.*, 1974a, 13, 331.
- Shoyab M., Evans R. M., Baluda M. A. *J. Virol.*, 1974b, 14, 47.
- Shoyab M., Markham P. D., Baluda M. A. *J. Virol.*, 1974c, 14, 225.
- Shoyab M., Markham P. D., Baluda M. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 1031.
- Siegert W., Komings R. N., Bauer H., Hofchneider P. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 888.
- Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J., Duesberg P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 50, 467.
- Slye M., Homes H. F., Wells H. G. *J. Med. Res.*, 1914, 30, 417.
- Smith H. S., Gelb L. D., Martin M. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 152.
- Smith R. E., Moscovici C. *Cancer Res.*, 1969, 29, 1356.
- Sokol F., Carp R. I. *J. Gen. Virol.*, 1971, 11, 177.
- Somers K., May J., Kit S., Stenback W. A., Trentin J. J. *Intervirology*, 1973, 1, 11.
- Soriano F., Shelburne C., Gökçen M. *Nature*, 1974, 249, 421.
- Southam C. M. *Cancer Res.*, 1963, 23, 1105.
- Southam C. M. *Europ. J. Cancer*, 1965, 1, 173.
- Spemann H. *Arch. Entwicklungsmech. Org.*, 1921, 48, 533.
- Spiegelman S., Burny A., Das M., Keydar J., Schlom J., Travnicek M., Watson K. *Nature*, 1970a, 227, 563.
- Spiegelman S. A., Burny A., Das M., Keydar J., Schlom J., Travnicek M., Watson K. *Nature*, 1970b, 228, 430.
- Spiegelman S., Watson K. F., Kacian D. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 2843.
- Steeves R. A., Eckner R. J., Bennett M., Mirand E. A. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1971, 46, 1209.
- Steeves R. A., Strand M., August T. *J. Virol.*, 1974, 14, 187.
- Stein H., Hausen P. *Science*, 1969, 166, 939.
- Stenkvist B. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1966, 67, 67.
- Stephenson J. R., Aaronson S. *Virology*, 1971, 46, 480.
- Stephenson J. R., Aaronson S. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972a, 69, 2798.
- Stephenson J. R., Aaronson S. A. *J. Exptl. Med.*, 1972b, 136, 175.
- Stephenson J. R., Aaronson S. A. *Virology*, 1973a, 54, 53.
- Stephenson J. R., Aaronson S. A. *Science*, 1973b, 180, 865.
- Stephenson J. R., Aaronson S. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 4925.
- Stephenson J. R., Aaronson S. A., Arnstein P. *Virology*, 1974, 61, 244.
- Stephenson J. R., Crow J. D., Aaronson S. A. *Virology*, 1974b, 61, 411.
- Stephenson J. R., Greenberger J. S., Aaronson S. A. *J. Virol.*, 1974a, 13, 257.
- Stephenson J. R., Reynolds R. K., Aaronson S. A. *Virology*, 1972c, 48, 749.
- Stephenson J. R., Reynolds R. K., Aaronson S. A. *J. Virol.*, 1973, 11, 218.
- Stephenson J. R., Tronick S. A., Reynolds R., Aaronson S. J. *Exptl. Med.*, 1974c, 139, 427.
- Stephenson M. L., Wirthlin L. L., Scott J., Zamechnik P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 1176.
- Steplewski Z., Knowles B., Koprowski H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 59, 769.
- Stich H. F., Yohn D. S. *Progr. Med. Virol.*, 1970, 12, 78.
- Stockert E., Old L., Boyse E. A. *J. Exptl. Med.*, 1971, 133, 1334.
- Stoker M. *Brit. Med. Bull.*, 1964, 20, 145.
- Stoker M. *Compar. Leukemia Res. Proc. Internat. Symp.*, Pergamon Press, 1966.
- Stoker M. *Nature*, 1968, 218, 234.
- Stoker M., Dulbecco R. *Nature*, 1969, 223, 397.
- Stockert E., Sato H., Boyse L., Old L. *Science*, 1972, 178, 862.
- Stoltz D. B., Stich H. F., Yohn D. S. *Cancer Res.*, 1967, 27, 587.
- Stone M. P., Smith R. E., Joklik W. K. *Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1974, 44.



- Strand M., August J. T.* Nature, 1971, 233, 137.
- Strand M., August J. T.* J. Biol. Chem., 1973, 248, 5627.
- Strand M., August J. T.* J. Virol., 1974a, 13, 171.
- Strand M., August J. T.* J. Virol., 1974b, 13, 1584.
- Strand M., Lilly F., August T. J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 3682.
- Strickland J. E., Kind P. D., Fowler A. K., Hellman A. J.* Nat. Cancer Inst., 1974, 52, 1161.
- Strohl W. A., Rouse H. C., Schlesinger R. W.* Virology, 1966, 28, 645.
- Strohl W. A., Rouse H., Teets K., Schlesinger R. W.* Arch. ges. Virusforsch., 1970, 31, 93.
- Stromberg K., Hurley N. E., Davis N. L., Rueckert R. R., Fleissner E. J.* Virol., 1974, 13, 513.
- Suarez H. G., Sonenshein G., Cassingena R., Tournier P.* In «Biology of Oncogenic Viruses». Amsterdam, 1970, p. 1.
- Suarez H. G., Sonenshein G. E., Estrade S., Bourall M. F., Cassingena R., Tournier P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1290.
- Sugino A., Okazaki R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, 70, 88.
- Svoboda J.* Nature, 1960, 186, 980.
- Svoboda J.* In The molecular biology of viruses. London, 1968, 249.
- Svoboda J., Dourmashkin R. J.* Gen. Virol., 1969, 4, 523.
- Svoboda J., Hlozaneck I.* Adv. Cancer Res., 1970, 13, 217.
- Svoboda J., Hlozaneck I., Mach O.* Folia Biol., 1972, 18, 149.
- Sweet R. W., Goodman N. C., Redfield R. R., Spiegelman S.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 1705.
- Swetley P., Brodano G. B., Knowles B. J.* Virol., 1969, 4, 348.
- Tai H. T., O'Brien R. L.* Virology, 1969, 38, 698.
- Takemoto K. K.* J. Nat. Cancer Inst., 1968, 41, 1401.
- Takemoto K. K., Mullarkey M. F. J.* Virol., 1973, 12, 625.
- Takemoto K. K., Rabson A. S., Mullarkey M. F. J.* Nat. Cancer Inst., 1974, 53, 1205.
- Takemoto K. K., Stone L. B. J.* Virol., 1971, 7, 770.
- Tanaka A., Nonoyama M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4658.
- Tanaka H., Tamura A., Tsujimura D.* Virology, 1972, 49, 61.
- Tavitian A., Hamelin R., Tchen P., Olofson B., Boiron M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 755.
- Taylor J. M., Faras A. J., Varmus H. E., Levinson W. E., Bishop J. M.* Biochemistry, 1973, 11, 2343.
- Taylor J. M., Varmus H. E., Faras A. J., Levinson W. E., Bishop J. M.* J. Mol. Biol., 1974, 84, 217.
- Tegtmeyer P. J.* Virol., 1972, 10, 591.
- Tegtmeyer P., Ozer H. L. J.* Virol., 1971, 8, 516.
- Teich N., Lowy D. R., Hartley J. W., Rowe W. P.* Virology, 1973, 51, 163.
- Temin H.* Nat. Cancer Inst. Mon., 1964a, 17, 557.
- Temin H. M.* Virology, 1964b, 23, 486.
- Temin H. M.* Cancer Res., 1966, 26, 212.
- Temin H. M.* Ann. Rev. Microbiol., 1971a, 25, 609.
- Temin H. M. J.* Nat. Cancer Inst., 1971b, 46, 111.
- Temin H. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1016.
- Temin H. M.* Ann. Rev. Genetics, 1974a, 8, 155.
- Temin H. M.* Adv. Cancer Res., 1974b, 19, 47.
- Temin H. M.* Cancer Res., 1974c, 34, 2835.
- Temin H. M., Baltimore D.* Adv. Virus Res., 1972, 17, 129.
- Temin H. M., Mizutani S.* Nature, 1970, 226, 1211.
- Temin H., Rubin H.* Virology, 1958, 6, 669.
- Tennant R. W., Schluter B., Yang W. K., Brown A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974a, 71, 4241.
- Tennant R. W., Schluter B., Yang W. K., Brown A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974b, 10, 4241.
- Teramoto Y., Puentes M., Young L. J. T., Cardiff R. D. J.* Virol., 1974, 13, 411.
- Thielen G. H., Gould D., Fowler M., Dungworth D. J.* Nat. Cancer Inst., 1971, 47, 881.
- Thomas D. C., Green M.* Virology, 1969, 39, 205.
- Thurzo V., Smida J., Smidova-Kovarova V., Simkovic D.* Acta Unio internat. contra cancerum., 1963, 19, 304.
- Ting R. C. J.* Virol., 1968, 2, 865.

- Todaro G. J. In «Persistent virus infections». N. Y., 1973, p. 81.
- Todaro G. J., Aaronson S. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, 61, 1272.
- Todaro G. J., Arnstein P., Parks W. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973a, 70, 859.
- Todaro G. J., Benveniste R. E., Lieber M. M., Sherr C. Virology, 1973b, 55, 506.
- Todaro G. J., Benveniste R. E., Lieber M. M., Sherr C. Virology, 1974a, 58, 65.
- Todaro G. J., Benveniste R. E., Lieber M., Sherr Ch. J. Virology, 1974b, 58, 65.
- Todaro G. J., Gallo R. C. Nature, 1973, 244, 206.
- Todaro G. J., Huebner R. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 1009.
- Todaro G. J., Sherr C. J., Benveniste R. E., Lieber M. Cell, 1974a, 2, 55.
- Todaro G. J., Takemoto K. K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, 62, 1031.
- Tompkins W., Walker D., Hinze H. C. J. Virol., 1969, 4, 603.
- Tooze J. The molecular biology of tumour viruses. Cold Spring Harbor, 1973.
- Toyoshima K., Friis R. R., Vogt P. K. Virology, 1970, 42, 163.
- Toyoshima K., Vogt P. K. Virology, 1969, 39, 930.
- Travnicek M., Riman J. Biochim. et Biophys. Acta, 1970, 199, 283.
- Travnicek M., Riman J. Neoplasma, 1973, 20, 113.
- Travnicek M., Riman J., Udvardy A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 54, 1347.
- Trentin J. J., Yabe V., Taylor G. Science, 1962, 137, 835.
- Tronick S. R., Stephenson J. R., Aaronson S. A. Virology, 1973, 54, 199.
- Tronick S., Stephenson J. R., Aaronson S. T. J. Virol., 1974, 14, 125.
- Tronick S. R., Stephenson J. R., Aaronson S. A., Kawakami T. G. J. Virol., 1975, 15, 115.
- Tsuchida N., Bhaduri S., Raskas H., Green M. Intervirology, 1973, 1, 27.
- Tsuchida N., Gilden R., Hatanaka M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974a, 71, 4503.
- Tsuchida N., Green M. Virology, 1974, 59, 258.
- Tsuchida N., Long G., Hatanaka M., Gilden R. Virology, 1974b, 60, 200.
- Tsuchida N., Robin M. S., Green M. Science, 1972, 176, 1918.
- Tsuchida N., Shih M., Gilden R. V., Hatanaka M. J. Exptl. Med., 1974c, 140, 218.
- Tsuchida N., Shih M., Gilden R., Hatanaka M. J. Virol., 1974d, 14, 1262.
- Tsuei D., Fujinaga K., Green M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 427.
- Tsukamoto K., Sugino J. J. Virol., 1972, 9, 465.
- Tung J., Vitetta E., Fleissner E. J. Exptl. Med., 1975, 141, 198.
- Tyler A. J. Nat. Cancer Inst., 1960, 25, 1197.
- Twardzik D. R., Papas T. S., Portugal F. H. J. Virol., 1974, 13, 166.
- Twardzik D., Simonds J., Oskarson M., Portugal F. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 52, 1108.
- Uchida S., Watanabe S. Virology, 1968, 35, 166.
- Uchida S., Watanabe S. Virology, 1969, 39, 721.
- Vaheri, Ruoslahti. Int. J. Cancer, 1973, 12, 361.
- Vaidya A. B., Black M., Dion A. S. Nature, 1974, 249, 565.
- Varmus H. E., Bishop J. M., Nowinski R., Sarkar N. Nature New Biol., 1972a, 238, 119.
- Varmus H. E., Bishop J. M., Vogt P. K. J. Mol. Biol., 1973c, 74, 613.
- Varmus H., Genitak R., Faras L., Bishop J. M. Proc. Nat. Acad. Sci., 1974a, 71, 3874.
- Varmus H., Heasley S., Bishop J. M. J. Virol., 1974b, 14, 895.
- Varmus H. E., Levinson W. E., Bishop J. M. Nature New Biol., 1971, 233, 19.
- Varmus H. E., Bishop J. M., Nowinski R. C., Sarkar N. J. Mol. Biol., 1973a, 79, 663.
- Varmus H., Vogt P. K., Bishop J. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973b, 70, 3067.
- Varmus H. E., Weiss R. A., Friis R. R., Levinson W., Bishop J. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972b, 69, 20.
- Vecchio G., Tsuchida M., Shanmugam G., Green M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 2064.
- Verma I., Mason W., Baltimore D. Nature, 1974b, 251, 27.

- Verma I. M., Menth N. L., Baltimore D. J. *Virology*, 1972, 10, 622.
- Verma I. M., Menth N. L., Fan H., Baltimore D. J. *Virology*, 1974a, 13, 1075.
- Verma I., Menth N. F., Manly K., Baltimore D. *Nature New Biol.*, 1971, 233, 131.
- Vernon M. L., McMahon J. M., Hackett J. J. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1974, 52, 987.
- Verwoerd D. W., Sarma P. S. *Int. J. Cancer*, 1973, 12, 551.
- Vesco C., Basilico L. *Nature*, 1971, 229, 336.
- Vidrine J. G., Harewood K. R., Bulfone L. M., Mayyasi S. J. *Gen. Virol.*, 1973, 20, 239.
- Vigier P. *Int. J. Cancer*, 1973, 11, 473.
- Vigier P., Bataillon G. *Virology*, 1971, 45, 313.
- Vogel A., Pollack R. J. *Virology*, 1974, 14, 1404.
- Vogt P. K. *Adv. Virus Res.*, 1965, 11, 293.
- Vogt P. K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, 58, 801.
- Vogt P. K. *Bibl. Haematol.*, 1969, 36, 153.
- Vogt M. J. *Mol. Biol.*, 1970, 47, 307.
- Vogt P. K. *Virology*, 1971, 46, 939.
- Vogt P. K. In «Possible Episomes in Eukaryotes». Ed. Silvestri L. Amsterdam, 1973, 130.
- Vogt M., Dulbecco R. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1960, 46, 365.
- Vogt M., Dulbecco R. *Virology*, 1962a, 16, 41.
- Vogt M., Dulbecco R. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1962b, 27, 367.
- Vogt M., Dulbecco R., Smith B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1966, 55, 956.
- Vogt P. K., Friis R. R. *Virology*, 1971, 43, 223.
- Vogt P. K., Weiss R. A., Hanafusa H. *J. Virol.*, 1974, 13, 551.
- Vosel A., Pollack R. J. *Cellular Physiol.*, 1973, 82, 181.
- Waldeck W., Kammer K., Sauer G. *Virology*, 1973, 54, 452.
- Walker D. L., Padgett B. L., Zurhein G. M. *Science*, 1973, 181, 674.
- Wall R., Darnell J. E. *Nature New Biol.*, 1971, 232, 73.
- Wall R., Weber J., Gage Z., Darnell J. J. *Virology*, 1973, 11, 953.
- Wang L. H., Duesberg P. H. *J. Virol.*, 1973, 12, 1512.
- Wang S., Kothari R. M., Taylor M., Hung P. *Nature New Biol.*, 1973, 242, 133.
- Warocquier R., Samaile J., Green M. *J. Virol.*, 1969, 4, 423.
- Warren R. J. *J. Virol.*, 1969, 4, 231.
- Watkins J. F. *J. Cell Sci.*, 1970, 6, 721.
- Watkins J. F., Dulbecco R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1967, 58, 1396.
- Watson K. F., Molling K., Bauer H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 51, 232.
- Watson K. F., Nowinski R. C., Yaniv A., Spiegelman S. J. *Virology*, 1972, 10, 951.
- Weber J. *J. Gen. Virol.*, 1974, 22, 259.
- Weil R., Michel M. R., Ruschmann G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1965, 53, 1468.
- Weil R., Petursson G., Kara J., Diggelmann H. *Mol. Biol. Viruses*. N. Y.—London, Acad. Press, 1967, 593.
- Weil R., Solomon C., May E., May P. *Abst. XXXIX Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1974, 110.
- Weiler E. *Acta Int. Cancer*, 1959, 15, 929.
- Weinberg R. A., Ben-Ishai Z., Newbold J. E. *Nature New Biol.*, 1972a, 238, 111.
- Weinberg R. A., Warnaar S. O., Winocour E. J. *Virology*, 1972b, 10, 193.
- Weiner L. P., Herndon R. M., Narayan O., Johnson R. *New Engl. J. Med.*, 1972a, 286, 385.
- Weiner L. P., Herndon R. M., Narayan O., Johnson R. T. *J. Virol.*, 1972b, 147.
- Weinstein D., Moorhead P. S. J. *Cellular Physiol.*, 1965, 65, 85.
- Weiss R. A. *Virology*, 1967, 32, 719.
- Weiss R. A. *J. Gen. Virol.*, 1969, 5, 511.
- Weiss M. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, 66, 79.
- Weiss R. A. In «Analytic and Experimental epidemiology of Cancer», 1973, 201.
- Weiss A. F., Portmann R., Risher H., Simon J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 609.
- Weiss R. S., Friis R. R., Katz E. *Virology*, 1971, 46, 920.

- Weiss R. A., Payne L. N. *Virology*, 1971, 45, 508.
- Weissbach A., Bolden A., Hanafusa H., Hanafusa T. J. *Virology*, 1972, 10, 321.
- Wells R. D., Falgel R. M., Larson J., Sweet P. *Biochemistry*, 1972, 11, 621.
- Westphal H. J. *Mol. Biol.*, 1970, 50, 407.
- Westphal H., Dulbecco R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, 59, 1158.
- Wever G. H., Kit S., Dubbs D. R. J. *Virology*, 1970, 5, 578.
- Whalley J. M. J. *Gen. Virol.*, 1973, 21, 39.
- Wilson S. H., Kuff E. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 1531.
- Winocour E. *Virology*, 1965, 25, 276.
- Winocour E. *Adv. Virus Res.*, 1969, 14, 153.
- Winocour E. *Adv. Cancer Res.*, 1971, 37.
- Winocour E., Kaye A. M., Stollar V. *Virology*, 1965, 27, 156.
- Winocour E., Robbins E. *Virology*, 1970, 40, 307.
- Winocour E., Sachs L. *Virology*, 1962, 16, 496.
- Witte O. N., Weissman I. L., Kaplan H. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 36.
- Wivel N. A., Lueders K. K., Kuff E. L. *J. Virol.*, 1973, 11, 329.
- Wivel N. A., Smith G. H. *Int. J. Cancer*, 1971, 7, 167.
- Wolf H., zur Hasen H., Becker W. *Nature New Biol.*, 1973, 244, 245.
- Wolfer L. G., Deinhardt F., Theilen G. H., Rabin H., Kawakami T., Bustad L. K. J. *Nat. Cancer Inst.*, 1971, 47, 1115.
- Wollmann R. L., Kirsten W. H. J. *Virology*, 1968, 2, 1241.
- Wong P. K. Y., McCarter J. A. *Virology*, 1974, 58, 396.
- Wong P. K. Y., Russ L. J., McCarter J. A. *Virology*, 1973, 51, 424.
- Wu A. M., Reitz M. S., Paran M., Gallo R. C. J. *Virology*, 1974, 14, 802.
- Wu A. M., Saragahdaran M., Gallo R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 1871.
- Wu A. M., Ting R. C., Paran M., Gallo R. C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 3820.
- Wyke J. *Exptl. Cellular Res.*, 1971, 66, 209.
- Wyke J. A. *Virology*, 1973, 52, 587.
- Wyke J. A., Linial M. *Virology*, 1973, 53, 152.
- Yaffe D., Gershon D. *Nature*, 1967, 215, 421.
- Yamamoto T., Rabinowitz Z., Sachs L. *Nature New Biol.*, 1973, 243, 247.
- Yamamoto H., Shimojo H. *J. Virol.*, 1971, 7, 419.
- Yaniv A., Ohno T., Kacian D. *Virology*, 1974, 59, 335.
- Yang S., Wivel N. A. J. *Virology*, 1973, 11, 287.
- Yoshiki T., Mellors R. C., Strand M., August J. T. *J. Exptl. Med.*, 1974, 140, 1011.
- Yoshikura H. *J. Gen. Virol.*, 1973, 19, 321.
- Yoshikura H. *Nature*, 1974, 252, 71.
- Yotsuyanagi Y., Ephrussi B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 4575.
- Zilber L. A. *Zbl. Bakteriologie Orig.*, 1923, 89, 250.
- Zilber L. A. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.*, 1962, 27, 513.
- Zilber L. A. *Prog. Exptl. Tumor Res.*, 1965, 7, 1.
- Zurhein G. M. *Prog. Med. Virol.*, 1969, 11, 185.



## ОГЛАВЛЕНИЕ

	Предисловие редактора . . . . .	3
	<b>ВИРУСО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ . . . . .</b>	<b>7</b>
Глава первая.	Развитие учения о роли вирусов в возникновении опухолей . . . . .	7
	<b>МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВИРУСО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕОРИИ . . . . .</b>	<b>34</b>
Глава вторая.	ДНК-содержащие опухолеродные вирусы	36
Глава третья.	Общая характеристика РНК-содержащих онкогенных вирусов . . . . .	60
Глава четвертая.	Биологическое действие онкогенных вирусов на клетки . . . . .	111
Глава пятая.	Индукция полной формы онкогенного вируса из опухолевой клетки . . . . .	160
Глава шестая.	Генетическая информация онкогенных ДНК-содержащих вирусов в опухолевых клетках . . . . .	174
Глава седьмая.	Интеграция генома онкорнавирусов . . . . .	196
Глава восьмая.	Эндогенные вирусы и «нормальная» интеграция . . . . .	242
	В заключение . . . . .	311
	Литература . . . . .	316

**БИБЛИОТЕКА**  
**Государственного**  
**медицинского института**  
гор. Алматы

138785

**АДТИ**  
**АХР-РЕСУРС МА**  
**ИТУ №**

*Лев Александрович Зильбер, Иосиф Самсонович Ирлин,  
Федор Львович Киселев*

**Эволюция вирусо-генетической теории возникновения  
опухолей**

Утверждено к печати *Научным советом по проблемам  
молекулярной биологии Академии наук СССР*

Редактор издательства *Г. В. Красильникова*  
Художник *Б. П. Кузнецов*  
Художественный редактор *Т. П. Поленова*  
Технический редактор *Е. Н. Евтянова*  
Корректор *Л. И. Харитонова*

Сдано в набор 4/VI 1975 г. Подписано к печати 26/XI 1975 г.  
Формат 60×90<sup>1/16</sup>. Бумага типографская № 1. Усл. печ. л. 21,5.  
Уч.-изд. л. 23,8. Тираж 4200. Т-17032. Тип. зак. 2478. Цена 1 р. 92 к.

Издательство «Наука». 103717 ГСП, Москва, К-62,  
Подсосенский пер., 21  
2-я типография издательства «Наука». 121099.  
Москва, Г-99, Шубинский пер., 10