

УДК 576.858.8

ВИРУСОЛОГИЯ

Г. Н. НАЗАРОВА, Л. Г. ТЮЛЬКИНА, Н. П. РОДИОНОВА,
А. С. КАФТАНОВА, И. Г. АТАБЕКОВ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДИСКОВИДНЫХ АГРЕГАТОВ ВИРУСНОГО БЕЛКА С КОРОТКИМИ ФРАГМЕНТАМИ РНК ВТМ

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 5 X 1972)

Известно, что процесс полимеризации белка вируса табачной мозаики (ВТМ) *in vitro* сопровождается образованием серии дискретных агрегатов (4S, 8S, 18–22S) возрастающего размера ⁽¹⁾. Агрегат 18–22S (20S-диск) построен из 34 субъединиц, упакованных радиально-симметрично в виде двух слоев (по 17 субъединиц в каждом) и имеет вид «шайбы» с внутренним отверстием и диаметром, соответствующим диаметру частицы ВТМ.

В процессе сборки ВТМ 20S-диск связывается с 5'-концом молекулы РНК ВТМ, содержащим участок, инициирующий реконструкцию (у.и.р.), узнаваемый белком ВТМ ⁽²⁻⁶⁾.

При условиях ограниченной реконструкции ВТМ удается обнаружить два типа неполных нуклеопротеидных комплексов (*н*-НПК); 1) *н*-НПК, в составе которого концевой участок молекулы РНК (около $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{4}$ длины всей РНК ВТМ) заключен в белковую оболочку ⁽⁷⁾, и 2) минимальный НПК (*м*-НПК), содержащий 30–40 белковых субъединиц, связанных с вирусной РНК. Возможно, что *м*-НПК представляет собой комплекс 20S-диска с РНК ВТМ.

Следует полагать, что в структуре белковых субъединиц ВТМ существует активный центр, связывающий триплет нуклеотидов, т. е. центр, ответственный за «белок — РНК»-взаимодействие при реконструкции. Помимо этого, в структуре мономера должны присутствовать активные центры, контролирующие «белок-белковые» взаимодействия. Ранее предполагалось, что конформация активных центров, узнающих соседние белковые молекулы, зависит от того, связан ли с триплетом нуклеотидов активный центр, узнающий у.и.р. ⁽⁸⁾. Аналогичное предположение о механизме конформационной перестройки при взаимодействии 20S-дисков с у.и.р. было высказано Батлером и Клугом ⁽²⁾. Известно, что белок ВТМ претерпевает конформационные изменения в процессе полимеризации, а также при реконструкции вируса, проявляющиеся в резком изменении его антигенных свойств ⁽⁹⁾.

Ранее было показано, что белок ВТМ способен селективно взаимодействовать с фрагментами, содержащими у.и.р. при инкубации с фрагментированной РНК ВТМ ⁽⁴⁻⁷⁾. При этом использовались относительно крупные фрагменты РНК (мол. вес 3×10^5 дальтон). В настоящей работе продемонстрирована возможность образования стабильного рибонуклеопротеидного комплекса (РНП) с участком 20S-диска и короткого (около 50 остатков) олигонуклеотида из РНК ВТМ. Образование этого РНП сопровождается конформационной перестройкой вирусного белка.

Препарат 20S-дисков получен, как описано ранее ⁽¹⁰⁾. Короткие (3S) фрагменты РНК выделяли после ограниченного гидролиза вирусной РНК панкреатической рибонуклеазой (РНКазой) на холоду ^(11, 12). Этот метод позволяет получить смесь олигонуклеотидов примерно одинакового размера (3S-фрагменты, содержащие около 50 нуклеотидных остатков), раз-

личающихся по своей нуклеотидной последовательности. Молярное отношение РНК (в форме 3S-фрагментов) к белку ВТМ (в форме 20S-дисков с примесью 4—8S-агрегата) составляло в инкубационной смеси 1:2. При этом исходили из величины мол. веса белка 600×10^3 (для 20S-диска) при мол. весе РНК (до гидролиза) 2×10^6 дальтон. Такое отношение РНК:белок необычайно высоко для опытов по реконструкции ВТМ, содержащего всего лишь 5% РНК. Эти условия были выбраны, так как предполагалось, что только незначительная часть (примерно $1/126$) 3S-фрагментов может содержать у.п.р, а остальная часть фрагментов не способна связываться с белком ВТМ, как это наблюдалось в опытах по реконструкции с более крупными фрагментами РНК ВТМ (⁴⁻⁶). Таким образом, в инкубационной смеси каждому 3S-фрагменту РНК ВТМ, содержащему у.п.р, должен был соответствовать, по крайней мере, один

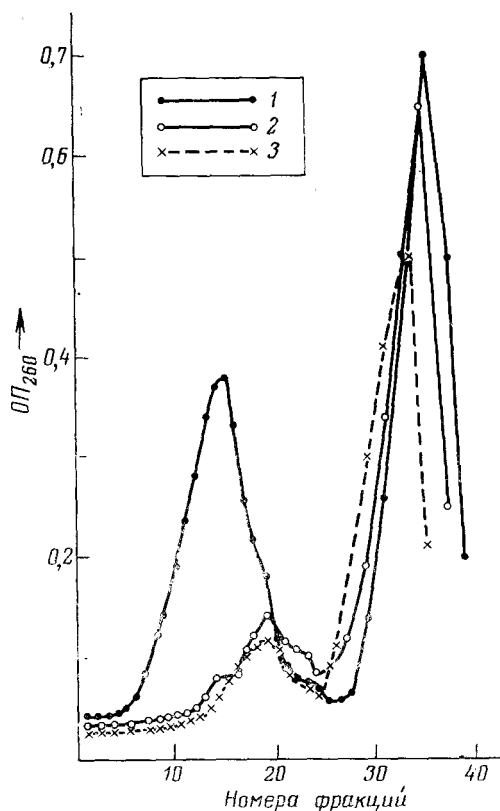


Рис. 1. Фракционирование центрифугированием в градиенте концентрации сахаразы (5—20%) материала, реконструированного из 20S-белка и 3S-фрагментов РНК ВТМ (1), 4,5S-фрагментов РНК ВМД (2), 6,0S-фрагментов РНК ОВ 3,4 (3). Седimentация справа налево. Центрифугирование в роторе SW 25.1 центрифуги «Spinco L2» в течение 17 час. при 22 тыс. об/мин

20S-диск. После инкубации (15—16 час. при 28°) смесь охлаждали до 4° и все последующие обработки проводили на холоду. Важно заметить, что белковые 20S-диски полностью диссоциируют на холоду до состояния 4S-белка. С другой стороны, можно было ожидать, что РНП, образованный 20S-диском и 3S-фрагментом РНК, содержащим у.п.р, окажется стабилен на холоду и будет выделен при центрифугировании и последующем фракционировании в градиенте концентрации сахаразы. Из рис. 1 следует, что такой РНП действительно формируется. Этот РНП имеет коэффициент седиментации около 30—40S (30S-РНП), поглощает у.ф. свет с максимумом при 260 мμ, отличаясь от нативного ВТМ меньшей величиной отношения $A_{260:280}$ (1,0—1,1 для 30S-РНП и 1,2—для ВТМ). По-видимому, содержание белка в 30S-РНП несколько выше в сравнении с интактным ВТМ. С другой стороны, соотношение $A_{260:280}$ в РНП, содержащем 34 белковые субъединицы и 50—60 нуклеотидных остатков, по-видимому, не должно превышать 0,9—1,0.

Отсутствие в препарате РНП-частиц с коэффициентом седиментации около 20S (20S-РНП) можно предположительно объяснить двумя причинами: 1) 30—40S-РНП представляет собой агрегат из двух-трех 20S-РНП, т. е. содержит 2—3 отдельных 3S-фрагмента РНК или (и) 2) образование 20S-РНП из 20S-белкового диска и 3S-фрагмента РНК сопровождается конформационной перестройкой белковых субъединиц, что облегчает дальнейшее параппивание длины РНП за счет присоединения дополнительных белковых субъединиц к частице 20S-РНП, содержащей один 3S-фрагмент, на основе белок-белковых взаимодействий. Последнее должно было бы привести к некоторому избытку содержания белка в 30S-РНП по сравнению с ВТМ.

Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что при инкубации 20S-белка ВТМ с фрагментами, полученными при гидролизе

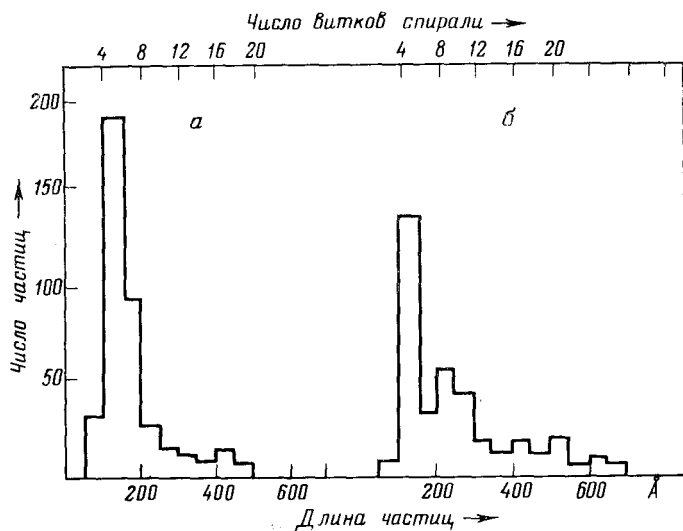


Рис. 2. Распределение длин частиц в препарате 30S-РНП. а — прямой анализ фракции сахарозного градиента, б — анализ тех же фракций после переосаждения в ультрацентрифуге

РНК вируса мозаики долихоса (ВМД) и огуречного вируса 3,4 (ОВ 3,4), образуется значительно меньшее количество 30S-РНП. Эта разница наблюдалась даже несмотря на то, что продукты гидролиза РНК ВМД и ОВ 3,4 имели несколько большие размеры (4,5 и 6,0S соответственно), чем фрагменты из РНК ВТМ.

Электронномикроскопический анализ 30S-РНП фракций сахарозного градиента показал, что основная масса материала представлена дисковидными частицами длиной 10—20 мμ, имеющими диаметр интактного ВТМ (рис. 2,3). Будучи расположены на торце, эти частицы имеют вид диска с внутренним отверстием. Следует заметить, что истинное количество коротких дисковидных частиц даже больше, чем указано на рис. 2, поскольку при составлении гистограмм не учитывались диски, лежащие на торце (рис. 3, см. вкл. к стр. 967).

Описываемые дисковидные частицы отличаются по своей структуре от типичных белковых парных 20S-дисков и от агрегатов в виде стопки парных дисков. Эти частицы имеют спиральную структуру с шагом спирали 2,3—2,5 мμ и весьма склонны к линейной агрегации (см. рис. 3а, б): переосаждение 30S-РНП в ультрацентрифуге приводит к резкому увеличению количества крупных частиц в препарате (рис. 2,3б). Структура длинных частиц, формируемых в результате такой агрегации, была иссле-

дована нами с применением метода оптической дифракции (¹²). Результаты такого анализа подтвердили, что эти частицы имеют спиральную структуру, не отличимую от ВТМ.

Сравнительный иммунохимический анализ белковых 20S-дисков с ВТМ и 30S-РНП, выделенным из соответствующих фракций сахарозного градиента, позволил утверждать, что частицы 30S-РНП антигенно идентичны нативному ВТМ, в то время как 20S-белковые диски обнаруживают с нативным ВТМ и 30S-РНП реакцию частичной идентичности (рис. 4).

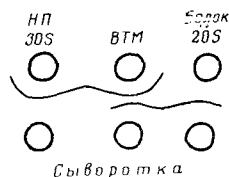


Рис. 4. Сравнительный антигенный анализ 30S-РНП, 20S-дисков белка ВТМ и ВТМ. Нижние колоды заполнены антисывороткой к ВТМ. Верхние колоды содержат антигены

Полученные результаты позволяют сделать следующие предположения. 1) По-видимому, белковые 20S-диски при инкубации со смесью коротких олигонуклеотидов РНК ВТМ связывают те из них, которые содержат у.и.р. Последнее согласуется с фактом специфического образования 30S-РНП с олигонуклеотидами из РНК ВТМ (но не из РНК ВМД и ОВ 3,4). 2) Минимальная олигонуклеотидная последовательность, необходимая для узнавания структурным белком, не превышает значительно 50 остатков; при этом минимальная длина у.и.р может быть ощутимо меньше. 3) Спектры поглощения у.ф. света 30S-РНП отличаются от спектров поглощения ВТМ, позволяя полагать, что в составе 30S-РНП часть белковых субъединиц не связана с РНК. 4) Взаимодействие короткого олигонуклеотида с гипотетическим центром белковой субъединицы, связывающим РНК, вызывает значительные конформационные изменения в белке ВТМ, выявленные иммунохимически.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
22 VIII 1972

Институт кристаллографии
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. L. D. Caspar, Adv. Protein Chem., **18**, 37 (1963). ² P. J. G. Butler, A. Klug, Nature New Biol., **229**, 42 (1971). ³ J. C. Thouvenel, H. Guillely et al., FEBS Lett., **16**, 204 (1971). ⁴ В. Г. Джавахия, Н. П. Родионова, И. Г. Атабеков, Рефераты докл. конфер. Лаб. биоорг. хим. МГУ, декабрь 1970, 1971, стр. 127.
- ⁵ V. G. Dzhabakhia, N. P. Rodionova, J. G. Atabekov, Virology, in press.
- ⁶ J. G. Atabekov, Proc. Symp. Gen. Biol. Structures, Norwich, 1971, in press.
- ⁷ N. P. Rodionova, N. E. Vesenina et al., Virology, **46**, 183 (1971). ⁸ И. Г. Атабеков, Докторская диссертация, МГУ, 1970.
- ⁹ M. H. V. van Regenmortel, Adv. Virus Res., **11**, 223 (1966). ¹⁰ N. P. Rodionova, N. E. Vesenina et al., Virology, in press.
- ¹¹ I. Sela, Arch. Biochem. and Biophys., **138**, 323 (1970).
- ¹² I. Sela, A. Maram, Arch. Biochem. and Biophys., **139**, 450 (1970). ¹³ A. Klug, J. E. Berger, J. Mol. Biol., **10**, 565 (1964).